

Efeitos cardiorrespiratórios da injeção intracisternal de cloreto de mercúrio

Bruna Fernandes Azevedo

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Fevereiro de 2011

Efeitos cardiorrespiratórios da injeção intracisternal de cloreto de mercúrio

Bruna Fernandes Azevedo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em 21 /02 /2011 por:

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Orientador - UFES

Prof. Dr. Henrique Azevedo Futuro Neto – Co-orientador - UFES

Prof. Dr. Renan Barros Domingues - EMESCAM

Prof^a. Dr^a. Cassia Marta de Toledo Bergamaschi- UNIFESP

Coordenador do PPGCF:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Fevereiro 2011

Azevedo, Bruna Fernandes, 1983.

Efeitos cardiorrespiratórios da injeção intracisternal de cloreto de mercúrio. [Vitória] 2011.

XIX, 91 p, 29,7 cm (UFES, M Sc., Ciências Fisiológicas, 2011)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Cloreto de Mercúrio 2. Efeito Central 3. Regulação Cardiorrespiratória

“Matar o sonho é matarmo-nos. E mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso.”

Fernando Pessoa

*Dedico este trabalho aos meus pais
Alvimar Gomes de Azevedo e Nereida
Fernandes Gomes, pelo incentivo, amor e
dedicação que tanto influenciaram meu
crescimento pessoal, espiritual e
profissional e ao meu namorado Flávio
Antunes da Silva por todos os anos de
paciência, confiança, incentivo aos meus
estudos e pelo apoio de sempre.*

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus, por mais essa conquista, pois sem ele, eu nada seria.
- Aos meus pais, Nereida e Alvimar, por acreditarem em mim sempre, por apoiarem minhas decisões e me darem tranquilidade para ir atrás dos meus sonhos. Aos meus irmãos Patrick, Gustavo, Vânia e Juliana, meus sobrinhos Érick, Giovana e Beatriz, minha madrastra Adriana e meu padrasto Célio pelo apoio e carinho de sempre.
- Meu agradecimento especial ao meu namorado Flávio Antunes da Silva pelos 13 anos de companheirismo, dedicação, amor, paciência, pelos conselhos, por entender o meu silêncio e acalmar minha euforia.
- Ao Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo por me confiar esse projeto, ter me apoiado nas horas fáceis e difíceis, pela sua paciência, amizade e pelos ensinamentos.
- A Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon pelo carinho, amizade, confiança e atenção de sempre.
- Ao Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto, pela co-orientação, por não ter medido esforços para que o projeto fosse realizado, pela dedicação, atenção de sempre e pelos ensinamentos.
- À Prof. Dr. Nyam Florencio da Silva por toda sua amizade, ajuda, dedicação e por abrir as portas de seu laboratório.
- A Prof^a. Dr^a. Alessandra Padilha pelo carinho e atenção de sempre.
- Ao Prof. Mario Dantas, pela sua amizade, disponibilidade e ajuda técnica proporcionada durante a realização desse trabalho

- À toda família LEMC: Karina, Jônaina, Maylla, Rogério, Lorena, Mirian, Fabiana, Eduardo, Juliana, Edna, Aurélia, Fernanda, Thaís, Kelly, Guilherme, Priscila, Larissa, Núbia, Bianca, Camila, Gilson e Neto.
- As amigas do Programa de Pós-Graduação Ludimila, Rebeca, Cintia e Renata pela amizade.
- A Prof^a. Ms. Wanize de Almeida Rocha por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa.
- A Prof^a. Ms. Andressa Marinho por me orientar e incentivar a fazer o mestrado, por todo conhecimento a mim concebido e por todas as suas orações.
- Aos funcionários Fonseca, Cláudia e Maria pela atenção com a qual sempre me atenderam.
- A CAPES, CNPq e FAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

I INTRODUÇÃO

1.1 Características do mercúrio	19
1.2 Forma de exposição do mercúrio	20
1.3 Transporte e eliminação do mercúrio	21
1.4 Efeito do mercúrio sobre o sistema nervoso central	21
1.5 Efeito do mercúrio sobre outros órgãos	22
1.6. Fisiologia da regulação central do sistema cardiorrespiratório	23
1.6.1 Áreas bulbares responsáveis pela regulação neural do sistema cardiorrespiratório	24
1.6.1.1 Núcleo do trato solitário	24
1.6.1.2 Bulbo ventrolateral caudal	25
1.6.1.3 Núcleo rostroventrolateral do bulbo	25
1.6.1.4 Área pressora caudal	26
1.6.1.5 Núcleo ambíguo	26
1.6.1.6 Núcleo dorsal motor do vago	27
1.6.2 Áreas supra-bulbares responsáveis pela regulação neural do sistema cardiovascular	27
1.7 Injeções intracisternais	28
1.8 Justificativa	29

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivo específico	30

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais	31
3.2 Anestesia	31
3.3. Procedimentos cirúrgicos	32
3.3.1 Canulação	32
3.3.2 Traqueostomia	32
3.3.3 Craneotomia	32
3.4 Estereotaxia	33
3.4.1 Posicionamento do animal	33
3.4.2 Acesso a cisterna magna para injeção intracisternal	33
3.5 Temperaturas corporais	33
3.6 Registro Hemodinâmico	33
3.7 Protocolos experimentais	34
3.7.1 Aplicação de Cloreto de Mercúrio (0,62 µg/Kg, 1,2 µg/Kg, 2,4 µg/Kg, 60 µg/Kg e 120 µg/Kg).	34
3.7.2 Injeção Intravenosa de Hidroclorato de hexametônio, Cloridrato de Prazosin e Metilnitrato de atropina.	34
3.8 Grupos experimentais	35
3.9 Análises Estatísticas	36
3.10 Drogas Utilizadas	36

IV RESULTADOS

4.1 Avaliações das alterações cardiorrespiratórias induzidas por injeções intracisternais de salina e 0,68; 1,2 e 2,4 µg/Kg de HgCl₂	37
4.2 Avaliações das alterações cardiorrespiratórias induzidas por injeções intracisternais de 60 µg/Kg de HgCl₂	40

4.3 Avaliações do comportamento cardiorrespiratório da injeção intracisternal de HgCl₂ 120 µg/Kg	44
4.4 Avaliações da participação do sistema nervoso autônomo nas alterações cardiorrespiratórias induzidas pela injeção intracisternal de 60 µg/Kg de HgCl₂.	45
4.5 Avaliações da participação do sistema nervoso simpático nas alterações cardiorrespiratórias induzidas pela injeção intracisternal de 60 µg/Kg de HgCl₂.	48
4.6 Avaliações da participação do sistema nervoso parassimpático nas alterações cardiorrespiratórias induzidas pela injeção intracisternal de 60 µg/Kg de HgCl₂.	51

V DISCUSSÃO

5.1 Efeitos da injeção intracisternal de HgCl₂ no sistema cardiorrespiratório	53
5.2 Participação do sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático) nas alterações cardiorrespiratórias induzidas pela injeção intracisternal de HgCl₂	55

VI CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO	74

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Evolução temporal dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina ou 0,68, 1,2 e 2,4 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	37
Figura 2: Evolução temporal dos valores de pressão arterial diastólica (PAD) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina ou 0,68, 1,2 e 2,4 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	38
Figura 3: Evolução temporal dos valores de pressão arterial média (PAM) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina ou 0,68, 1,2 e 2,4 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	38
Figura 4: Evolução temporal dos valores de frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina ou 0,68, 1,2 e 2,4 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	39
Figura 5: Evolução temporal dos valores de frequência respiratória (FR) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina ou 0,68, 1,2 e 2,4 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	39
Figura 6: Evolução temporal dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	41
Figura 7: Evolução temporal dos valores de pressão arterial diastólica (PAD) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	41

Figura 8: Evolução temporal dos valores de pressão arterial média (PAM) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	42
Figura 9: Evolução temporal dos valores de frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	42
Figura 10: Evolução temporal dos valores de frequência respiratória (FR) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	43
Figura 11: Registro ilustrativo das alterações cardiorrespiratório do grupo Cloreto de Mercúrio antes e após injeção intracisternal de cloreto de mercúrio na dose de 120 µg/Kg.	44
Figura 12: Evolução temporal dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio ganglionar e injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	45
Figura 13: Evolução temporal dos valores de pressão arterial diastólica (PAD) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio ganglionar e injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	46
Figura 14: Evolução temporal dos valores de pressão arterial média (PAM) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio ganglionar e injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	46
Figura 15: Evolução temporal dos valores de frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio ganglionar e injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	47

Figura 16: Evolução temporal dos valores de frequência respiratória (FR) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio ganglionar e injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	47
Figura 17: Evolução temporal dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 e injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	49
Figura 18: Evolução temporal dos valores de pressão arterial diastólica (PAD) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 e injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	49
Figura 19: Evolução temporal dos valores da pressão arterial média (PAM) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 e injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	50
Figura 20: Evolução temporal dos valores de frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 e injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	50
Figura 21: Evolução temporal dos valores de frequência respiratória (FR) dos grupos Controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 e injeção intracisternal de salina ou 60µg/Kg de cloreto de mercúrio.	51
Figura 22: Registro ilustrativo das alterações cardiorrespiratório do grupo Mercúrio, após injeção intravenosa de metilatropina, antes e depois da injeção intracisternal de cloreto de mercúrio na dose de 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.	52

Tabela

Tabela 1: Efeitos da injeção intracisternal de cloreto de mercúrio na pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória dos grupos controle e Cloreto de Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 e injeção intracisternal de salina ou 60 µg/Kg de cloreto de mercúrio.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância

APC- Área pressora caudal

bpm – Batimentos por minuto

Ca⁺ - Cálcio

CH₃CH₃Hg⁺ - Dimetilmercúrio

CH₃Hg⁺ - Metilmercúrio

cm – Centímetros

CO₂ - Dióxido de carbônico

CT - Controle

CVLM - Bulbo Ventrolateral Caudal

dm³ – Diâmetros cúbico

DMV - Núcleo dorsal do vago

EPM - Erro-padrão da média

FC - Frequência cardíaca

FR – Frequência respiratória

g – Grama

°C – Graus Celsius

GABA - Ácido gama-aminobutírico

Hexa - Hexametônio

Hg(CNO)₂ - Fulminato de mercúrio

Hg⁺ - Mercúrio mercurioso

Hg⁺⁺ - Mercúrio mercúrio

Hg⁰ - Mercúrio elementar metálico

Hg₂Cl₂ - Cloreto mercurioso

HgCl₂ - cloreto de mercúrio

HgS - Sulfeto de mercúrio

IC - Intracisternal

IML - Coluna intermédio lateral

i.v - Intra-venoso

Kg - Kilograma

Metil - Metil-atropina

μg – Micrograma

mg – Miligrama

ml – Mililitro

mm – Milímetros

mmHg – Milímetros de mercúrio

μl - Microlitro

NA - Núcleo ambíguo

NaCl - Cloreto de Sódio

NTS - Núcleo do trato solitário

PA - Pressão arterial

PAD - Pressão arterial diastólica

PAM - Pressão arterial média

PAS - Pressão arterial sistólica

Pras - Prasozin

PE – Polietileno

% - Porcentagem

rpm – Respirações por minuto

RVLM - Bulbo rostralventroateral

SNC - Sistema nervoso central

UI – Unidade internacional

α – Alfa

β - Beta

Resumo

Inúmeros estudos foram realizados com o objetivo de desvendar as alterações decorrentes da intoxicação por mercúrio no sistema nervoso central (SNC), bem como os receptores e neurotransmissores envolvidos em tais alterações. No entanto, pouco se sabe sobre as alterações cardiopulmonares decorrentes dessa intoxicação. Assim sendo, essa pesquisa teve como objetivo avaliar as alterações na PAS (pressão arterial sistólica), PAD (pressão arterial diastólica), PAM (pressão arterial média), FR (frequência respiratória) e FC (frequência cardíaca) após a injeção intracisternal (IC) de cloreto de mercúrio e analisar a participação do sistema nervoso autônomo em tais respostas. Foram utilizados ratos Wistar (300g). Os ratos foram divididos em onze grupos, quatro grupos Controle que receberam solução salina (5 µl, i.c); salina (5 µl, i.c) e hexametônio (20 mg/Kg i.v); salina (5 µl, i.c) e prazosin (1mg/Kg, i.v) e salina (5 µl, i.c) e metilatropina (1 mg/Kg i.v) e sete grupos experimentais que receberam microinjeções HgCl_2 nas doses de 0,68, 1,2, 2,4, 60 e 120 µg/ Kg (5µl, i.c) ; 60 µg/ Kg de HgCl_2 , (5µl, i.c) e hexametônio (20 mg/Kg i.v), 60 µg/ Kg de HgCl_2 , (5µl, i.c) e prazosin (1mg/Kg i.v) e 60 µg/ Kg de HgCl_2 (5µl, i.c) e metilatropina (1 mg/Kg i.v). Após indução anestésica com halotano foi feita a canulação da veia femoral e anestesia plena com uretana (1,2 g / Kg). Em seguida foi realizada a canulação da artéria femoral para registro da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Foi realizado traqueostomia para registro da frequência respiratória (FR). A exposição da cisterna magna foi feita através da retirada dos músculos esplênico da cabeça, semi-espinhal cefálico e trapézio. O animal foi colocado no estereotático e posicionado em decúbito ventral com estabilização da cabeça. Depois do período de estabilização, as soluções foram injetadas (salina ou HgCl_2 , ic) e os registros foram obtidos durante 50 minutos. O envolvimento do sistema nervoso autônomo (SNA) foi avaliado através da injeção intravenosa de hexametônio (20 mg/kg, iv), prazosin (1 mg/kg, iv) e metilatropina (1mg/kg, iv) em ambos os grupos, estas injeções intravenosas foram realizadas 10 minutos antes da injeção de HgCl_2 ou salina. A injeção Intracisternal de salina ou de 0,68, 1,2, 2,4 µg / Kg de HgCl_2 não

modificou os parâmetros basais do sistema cardiorepiratório. A dose de 120 µg / kg provocou a parada respiratória e morte dos animais do grupo Mercúrio. Por outro lado, a microinjeção de 60 µg/kg HgCl₂ i.c. induziu um aumento significativo (p <0,05) na PAS aos 30, 40 e 50 min, DAP aos 5, 10, 20, 30, 40 e 50 min, PAM aos 5, 10, 20, 30, 40 e 50 e redução da RF aos 5, 10, 20, 40 e 50 min no grupo Mercúrio. Após administração de Hexametônio esses efeitos foram abolidos. O bloqueio de receptores α₁-adrenérgicos aboliu o aumento da PAS, PAD, PAM e FC após microinjeção 60µg/kg HgCl₂. Por outro lado, este tratamento aumentou a FR. Após a injeção de Metilatropina (1mg / Kg iv), os animais evoluíram com depressão respiratória, culminando com parada respiratória e morte. Nossos resultados demonstram que os aumentos na pressão arterial sistólica, diastólica e média induzida pela injeção de cloreto de mercúrio são mediados por ativação do sistema nervoso simpático.

Abstract

The present studies were conducted to changes arising from mercury poisoning in the central nervous system (CNS), with a focus on determining the receptors and neurotransmitters involved. Currently, little is known regarding the neurological basis of the cardiopulmonary effects of mercury poisoning. We evaluated changes in systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), mean arterial pressure (MAP), respiratory rate (RR) and heart rate (HR) following a 5 μ l intracisternal (i.c) injection of mercuric chloride (HgCl₂) and the participation of the autonomic nervous system in these responses. Animals were utilized 58 distributed randomly into 10 groups and administered a 5 μ L intracisternal injection of 0.68 μ g/kg HgCl₂ (n =7), 1.2 μ g/kg HgCl₂ (n=7), 2.4 μ g/kg HgCl₂ (n=7), 60 μ g/kg HgCl₂ (n=7), 120 μ g/kg HgCl₂ (n=3), saline (control) (n=7), 60 μ g/kg HgCl₂ plus prazosin (n=6), saline plus prazosin (n=6), 60 μ g/kg HgCl₂ plus metilatropina (n=4) or saline plus metilatropina (n=4)HgCl₂. Anesthesia was induced with halothane and maintained as needed with urethane (1.2 g/kg) administered intravenously (i.v.) through a cannula placed in the left femoral vein. The left femoral artery was also cannulated to record systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP) and heart rate (HR). A tracheotomy was performed to record respiratory rate. Animals were placed in a stereotaxic frame, and the cisterna magna was exposed. After a stabilization period, solutions (saline or HgCl₂) were injected i.c., and cardiopulmonary responses were recorded for 50 minutes. Involvement of the autonomic nervous system was assessed through the i.v. injection of hexamethonium (20 mg/kg), prazosin (1 mg/kg) and methylatropine (1mg/kg) 10 minutes before the i.c. injection of HgCl₂ or saline. Treatment with 0.68, 1.2, 2.4 μ g/kg HgCl₂ or saline did not modify basal cardiorespiratory parameters, whereas the 120 μ g/kg dose induced acute toxicity, provoking respiratory arrest and death. The administration of 60 μ g/kg HgCl₂ , however, induced significant increases ($p < 0.05$) in SAP at the 30°, 40° and 50° min, timepoints, DAP at the 5°, 10°, 20°, 30°, 40° and 50° timepoints and MAP at the 5°, 10°, 20°, 30°, 40° and 50° timepoints . RR was significantly decreased at the 5°, 10°, 20°, 40° and 50°min timepoints; however, there was no change in HR. Hexamethonium

administration, which causes non-specific inhibition of the autonomic nervous system, abolished the observed cardiorespiratory effects. Similarly, prazosin, a α_1 -adrenoceptor blocker that specifically inhibits sympathetic nervous system function, abolished HgCl_2 induced increases in SAP, DAP and MAP without affecting HR and RR. Methylatropine (1mg/Kg), a parasympathetic nervous system inhibitor, exacerbated the effects of HgCl_2 and caused slow-onset respiratory depression, culminating in respiratory arrest and death. Our results demonstrate that increases in SAP, DAP and MAP induced by the i.c. injection of mercuric chloride are mediated by activation of the sympathetic nervous system.

Keywords: Mercury chloride, central effects, cardiopulmonary regulation.

I INTRODUÇÃO

Há mais de 2500 anos a.c os homens pré-históricos utilizavam o *cinábrio* (sulfeto de mercúrio), devido a sua coloração vermelho-dourada, para desenhar nas paredes das cavernas e realizar pinturas faciais. Posteriormente, o mercúrio passou a ser utilizado na amalgamação (queima direta de mercúrio metálico ligado ao cascalho, promovendo a separação do ouro), em fotografia e como anti-séptico no tratamento da sífilis. (Hylander & Meili, 2003; Clarkson *et al.*, 2007, Ekino *et al.*, 2007).

A exposição ao mercúrio trouxe efeitos maléficos à saúde dos seres humanos, porém as alterações resultantes da exposição dos seres humanos ao mercúrio só chamaram a atenção da sociedade científica após os acidentes ocorridos no Japão e Iraque. Na década de 60, no Japão ocorreu um grave acidente decorrente da deposição de dejetos industriais com grande quantidade de mercúrio na Baía de Minamata. Esse mercúrio foi então ingerido através do consumo de peixes, desencadeando assim, sinais e sintomas como ataxia, deterioração da fala, constrição do campo visual, alterações sensoriais, surdez, cegueira, tremores, movimentos involuntários, deficiência mental, coma e morte. Recém-nascidos cujas mães foram contaminadas desenvolveram retardo mental, neuropatia periférica, paralisia cerebral e cegueira. Essas alterações ficaram conhecidas como Doença de Minamata ou Síndrome de Hunter-Russell (Gochfeld, 2003, Takeuchi *et al.*, 1996). No Iraque a intoxicação do mercúrio ocorreu em 1971, quando grãos de trigo foram tratados com fungicidas contendo mercúrio orgânico. Essa intoxicação matou mais de 500 pessoas que ingeriram pão feito com o trigo contaminado. (Bakir *et al.*, 1973, Takeuchi *et al.*, 1996, Clarkson *et al.*, 1993).

No Brasil, especialmente na região Amazônica e em Minas Gerais a intoxicação por mercúrio se dá através da utilização de métodos arcaicos e perigosos na extração do ouro, pois através da amalgamação grande quantidade de vapor de mercúrio é eliminada e imediatamente inalada pelo garimpeiro e também contamina o meio ambiente (Pestana & Formoso, 2003, Passos & Mergler, 2008).

1.1 Características do mercúrio

O mercúrio tem como característica ser líquido e altamente maleável, quando se encontra em condições normais de temperatura e pressão (Azevedo, 2003). Seu nome é derivado do latim, *hydrargyrum*, que significa prata líquida, metal ao qual se assemelha (HSDB, 2004). O mercúrio é classificado em três principais grupos: mercúrio elementar, mercúrio orgânico e inorgânico. Sendo os compostos inorgânicos também chamados de sais de mercúrio, oriundos da junção do mercúrio com o cloro, enxofre ou oxigênio e os compostos de mercúrio orgânicos também chamados de organometálicos, originados da ligação covalente entre o mercúrio e o carbono (HSDB, 2004).

O mercúrio elementar metálico (Hg^0), em sua forma líquida é pouco absorvido e representa pequeno risco à saúde. Contudo, se o mesmo estiver sob a forma de vapor de mercúrio é rapidamente absorvido através dos pulmões, podendo levar a danos no organismo (Clarkson *et al.*, 2007; Houston, 2007, ATSDR, 1999). O mercúrio metálico, por possuir expansão volumétrica uniforme, alta tensão superficial e não possuir aderência às superfícies vítreas é utilizado em esfigmomanômetro e termômetros. Por possuir baixa resistência elétrica e alta condutividade térmica, o mercúrio metálico é empregado em materiais eletro-eletrônicos. Devido ao seu alto poder de oxidação, o mercúrio metálico é usado em operações eletroquímicas como na indústria de cloro e soda. Devido à facilidade de formação de amálgamas com outros metais, é utilizado na indústria metalúrgica, na odontologia e no garimpo (Micaroni *et al.*, 2000).

O mercúrio inorgânico pode ser encontrado em diferentes estados quando combinados com outros elementos químicos dentre eles se destacam o cloreto de mercúrio (HgCl_2) que é altamente tóxico e corrosivo; o cloreto mercurioso (Hg_2Cl_2); o sulfeto de mercúrio (HgS) que possui coloração vermelha e devido a isso é utilizado como pigmento de tintas e o fulminato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{CNO})_2$) utilizado como detonador em explosivos (HSDB, 2004, Azevedo, 2003; ATSDR, 1999).

A forma orgânica é derivada a partir da biotransformação do mercúrio inorgânico como o íon mercúrico em metilmercúrio (CH_3Hg^+) e dimetilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_3\text{Hg}^+$) (Johnson, 2004). Alguns destes compostos também chamados

de organometálicos foram usados como pesticidas e anti-sépticos. (WHO, 1990).

1.2 Formas de exposição do mercúrio

O mercúrio é considerado hoje um poluente ambiental de alto risco à saúde pública devido a sua elevada toxicidade e mobilidade nos ecossistemas (Davis *et al.*, 1994; Alexandre, 2006). Sua exposição pode ocorrer através de fontes naturais e artificiais derivadas de atividades humanas. Como fontes artificiais se destacam as queimas de combustíveis fósseis, indústrias de cloro-álcali, mineração, queima de lixo e uso do carvão e petróleo (Davidson *et al.*, 2006; Lindberg *et al.*, 2007; WHO, 1990).

As fontes naturais têm como principais emissores os desgastes de materiais geológicos, atividades vulcânicas, terremotos, erosão e também a volatilização do mercúrio presente no ambiente marítimo e na vegetação (WHO, 1990; Boening, 2000; Swain *et al.*, 2000; EPA, 1997). O mercúrio emitido tanto de forma natural como decorrente de atividade humana encontra-se na forma inorgânica principalmente como vapor metálico (Hg^0) (Hansen & Danscher, 1997).

Dentre todas as fontes naturais de emissão de mercúrio as mais importantes são as provenientes da desgaseificação da crosta terrestre. Devido à erosão e aos ciclos geoquímicos, estima-se que mais de cinco toneladas de mercúrio são lançados ao mar todos os anos. Com isso a crosta terrestre torna uma importante fonte de contaminação dos meios aquáticos. (Nascimento & Chasin, 2001).

O ciclo do mercúrio no meio ambiente compreende a emissão, a circulação atmosférica através de seus vapores e a precipitação que ocorre com as chuvas o que faz com que o mercúrio retorne às terras e as águas (Boening, 2000). A emissão do mercúrio constitui parte importante do ciclo deste metal na natureza e pode ocorrer de forma natural, por meio de processos naturais ou por resultado de atividades humanas como citado acima (EPA, 1997).

1.3 Transporte e eliminação do mercúrio

Por possuir uma característica lipossolúvel o mercúrio é altamente difusível, passando pelas membranas celulares, barreira hemato-encefálica e placentária chegando aos órgãos alvo. Quando na corrente sanguínea, o mercúrio sofre rápida oxidação nas hemácias e nos tecidos por meio da catalase e peroxidase transformando-se em mercúrio inorgânico (mercúrio mercúrio - Hg^{++}) e mercúrio mercurioso (Hg^+) o que limita sua absorção (Halbach & Clarkson, 1978; Hursh *et al.*, 1988; Asano *et al.*, 2000; Clarkson *et al.*, 2007). O mercúrio inorgânico tem baixa lipofilidade e com isso pouca capacidade de ultrapassar as membranas celulares (Clarkson *et al.*, 2007).

O mercúrio oxidado une-se fortemente ao grupamento $-\text{SH}$ e como consequência, inativa enzimas por sua toxicidade, o que pode levar a lesão tecidual além de interferir em vários processos metabólicos (Malmstrem *et al.*, 1992; Asano *et al.*, 2000; Gilman *et al.*, 2007).

O metilmercúrio ingerido é quase que completamente absorvido e transportado pela corrente sanguínea (WHO, 1990). É através dela, que em cerca de seis dias, as pessoas expostas podem alcançar concentrações tóxicas no sistema nervoso central (Berlin, 1986). O metilmercúrio entra na célula em grande parte pela formação de um complexo com a L-cisteína e a homocisteína, sendo eliminado conjugado com a glutathione (Ballatori & Clarkson, 1985).

Após ser absorvido ele é distribuído primariamente para o sistema nervoso central e rins. Sua eliminação se dá geralmente pela urina e fezes (Brodkin *et al.*, 2007).

1.4 Efeitos do mercúrio sobre o Sistema Nervoso Central (SNC)

No sistema nervoso central (SNC) os efeitos do mercúrio inorgânico são: irritabilidade, fadiga, mudanças comportamentais, tremores, cefaléia, perda auditiva e cognitiva, disartria, incoordenação motora e alucinações podendo estes pacientes evoluírem com óbito. Já a exposição ao metilmercúrio na mulher grávida e na primeira infância leva a situações como alterações no desenvolvimento do SNC do feto ou da criança (Graeme & Pollack, 1998; Nascimento & Chasin, 2001).

Alguns autores relatam que a ação do mercúrio no sistema nervoso central se dá pela sua união ao grupamento –SH, o que leva a inibição de enzimas que contêm este grupamento (Yee & Choi, 1994). Essa união faz também com que o mercúrio iniba vários receptores (muscarínicos, dopaminérgicos e nicotínicos), além de promover o bloqueio do canal para Ca^{+} em neurônios ganglionares (Weinsberg et al., 1995).

Além de alterar a permeabilidade dos canais para cálcio como citado anteriormente, o mercúrio inorgânico tem a capacidade de aumentar a permeabilidade da corrente para cloro dos receptores GABA_A no gânglio da raiz dorsal, o que cursa com a hiperpolarização neuronal (Huang & Narahashi, 1996).

O aumento da liberação de neurotransmissores como acetilcolina, dopamina, norepinefrina e serotonina são relatados por alguns autores como efeitos tanto do metilmercúrio quanto do cloreto de mercúrio (Atchison & Narahashi, 1982; Miyamoto, 1983; Atchison, 1986; Traxinger & Atchison, 1987, Mckay et al., 1986; Nakazato et al., 1979).

Todas as alterações nos processos de transmissão sináptica, nos processos relativos a canais iônicos e nas alterações de funcionalidade enzimáticas causadas pela intoxicação com as diferentes formas de apresentação do mercúrio citadas acima são importantes para produzir os múltiplos sinais e sintomas da intoxicação.

1.5 Efeitos do mercúrio sobre outros órgãos

Inúmeros são os trabalhos que mostram as alterações cardiovasculares decorrentes do efeito do mercúrio. Alterações como o aparecimento de arritmias, redução da atividade eletromecânica do coração (condução átrio-ventricular e desenvolvimento de força) e da pressão sistólica em corações isolados expostos a concentrações micromolares (Massaroni *et al.*, 1992 e 1995; Vassallo *et al.*, 1999). Aumento da resistência vascular pulmonar e redução da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) em ratos anestesiados e tratados com concentrações mais altas de HgCl_2 (5 mg/kg) (Rossoni et al., 1999). Além de aumento da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) após administração aguda de baixas doses de cloreto de mercúrio (Machado *et al.* 2007).

O mercúrio também exerce efeitos sobre os pulmões, sistema imunológico, reprodutor e além da exposição ao metal estar possivelmente relacionado com aumento da incidência de câncer (Gómez *et al.*, 2007; Gleichmann *et al.*, 1989).

O mercúrio é uma substância nefrotóxica que induz a falência renal e causa necrose tubular principalmente dos túbulos proximais (Clarkson, 1997; Zallups, 2000; Stacchiotti *et al.*, 2004) sendo as lesões renais dose-dependentes (Houser *et al.*, 1992; Bohets *et al.*, 1995; Burton *et al.*, 1995; Pelletier *et al.*, 1987 e Bagenstose *et al.*, 1999).

Pelo acima exposto fica claro que a intoxicação pelo mercúrio afeta vários sistemas de nosso organismo. O presente trabalho, no entanto, foca sua atenção nas repercussões na regulação neural do sistema cardiorrespiratório, uma área ainda pouco explorada. Para melhor situarmos nosso objeto de estudo, faremos a seguir uma breve revisão das áreas bulbares envolvidas no controle cardiorrespiratório.

1.6 Fisiologia da regulação central do sistema cardiorrespiratório

Há muito tempo já é sabido que perfusão tecidual, e conseqüentemente, as trocas entre os capilares e os tecidos dependem da manutenção da pressão arterial (PA) em níveis de normalidade. O mecanismo responsável pelo controle da PA se dá por dois tipos: os que operam a curto prazo e aqueles que atuam a longo prazo. A regulação a curto prazo ocorre através de mecanismos neurais que corrigem batimento a batimento os desvios da PA dos seus níveis basais, sendo essas correções, efetuados por mecanismos neurais que envolvem estruturas bulbares.

Os mecanismos de regulação da pressão arterial a longo prazo envolvem a síntese e liberação de hormônios como renina, fator natriurético atrial e vasopressina para a circulação sanguínea.

1.6.1 Áreas bulbares responsáveis pela regulação neural do sistema cardiovascular.

1.6.1.1 Núcleo do Trato Solitário (NTS)

As áreas responsáveis pela regulação neural da pressão arterial, frequência cardíaca e frequência respiratória, estão situadas nos núcleos bulbares, sendo o núcleo do trato solitário (NTS) um importante sítio de interação e processamento dos sinais aferentes relevantes a este processo. O NTS é constituído por diferentes grupos de neurônios, os quais se estendem na região dorsal do bulbo.

O NTS é uma das estruturas responsáveis pela geração e controle da atividade autonômica simpática e parassimpática (Guyenet, 1985). É uma área onde ocorre integração das informações relacionadas à PA, FC, enchimento venoso, atividade cardíaca, composição química do sangue etc. Após análise e processamento dessas informações, a mesma é encaminhada a outras regiões do sistema nervoso central, especialmente para as áreas ventrolaterais do bulbo que funcionalmente podem ser divididas em duas partes: uma parte rostral, que parece participar do controle tônico da PA e atividade barorreflexa, e a parte caudal, que seria um responsável pela atividade simpática tônica (Sved et al, 2000; Campos et al., 2001).

O NTS também tem um papel importante na modulação parassimpática cardiorreflexa, pois manda projeções pré-ganglionares parassimpáticas para núcleos bulbares parassimpáticos, como o núcleo dorsal motor do vago (DMV) em algumas espécies e para o núcleo ambíguo (NA). (McAllen e Spyer, 1976; Nosaka et al., 1982; 1979 ; Spyer, 1979; Loewy e Spyer, 1990).

É sabido que no NTS existe a participação de um grande número de neurotransmissores e/ou neuromoduladores envolvidos no controle cardiovascular e na modulação da atividade eferente simpática. Dentre os neurotransmissores e/ou neuromoduladores, podemos destacar: as aminas biogênicas (dopamina, histamina, serotonina, acetilcolina) e os neuropeptídeos (vasopressina, angiotensina, encefalinas, neuropeptídeos, bradicinina) (Amstrong et al, 1982; Cassel et al, 1992).

1.6.1.2. *Bulbo Ventrolateral Caudal (CVLC)*

O CVLM recebe projeções glutamatérgica oriundas do NTS e emite projeções gabaérgicas para o núcleo rostroventrolateral do bulbo (RVLM) sendo esta a principal área vasopressora do bulbo (Urbanski e Sapru, 1988; Yu e Gordon, 1996; Aicher et al., 1995). Com isso toda vez que o CVLM é inativado, ocorre um aumento na atividade nervosa simpática (Cravo et al, 2006) e quando o CVLM é estimulado, a resposta esperada é hipotensão e bradicardia (Urbanski & Sapru, 1988; Agarwal et al, 1989; Marchenko & Sapru, 2003), sendo a hipotensão um resultado da inibição do RVLM, através de uma ação inibitória (Urbanski & Sapru, 1988b; Agarwal et al, 1991; Verberne & Guyenet, 1992; Sved et al, 2000).

1.6.1.3 *Núcleo Rostroventrolateral do Bulbo (RVLM)*

O núcleo rostroventrolateral do bulbo (RVLM) é responsável pela manutenção do tônus vascular (Campos, 2008). Os neurônios presentes nesta área determinam a frequência de despolarização dos neurônios pré-ganglionares simpáticos (Spyer, 1990).

O RVLM possui neurônios responsáveis pela gênese e manutenção do tônus simpático (Kishi et al, 2001; Oliveira-Sales et al, 2010) os quais mandam projeções excitatórias para coluna intermédia lateral (IML) na medula espinhal (Guyenet, 1990). Os neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na coluna IML na medula espinhal por sua vez irão estimular os neurônios pós-ganglionares nos gânglios simpáticos os quais irão distribuir a atividade simpática para os diversos órgãos e sistemas (Gebber, 1990; Sved & Gordon, 1994). O RVLM é a região mais importante na gênese e na modulação das aferências simpáticas (Barman, 1984; Ross et al. 1984, Guyenet, 1985).

O principal modulador da atividade do RVLM é o CVLM, porém o RVLM também recebe projeções diretas da área pressora caudal (APC), núcleo do trato solitário (NTS) importantes para regulação da homeostasia.

Estudos comprovam a existência de uma via excitatória direta do NTS para o RVLM (Urbanski & Sapru, 1988; Mauad & Machado, 1998), e deste para a coluna intermediolateral (IML) da medula espinhal, de onde partem os neurônios simpáticos para o sistema cardiovascular.

1.6.1.4 Área Pressora Caudal (APC)

A APC é uma área bulbar que se conecta ao CVLM através de interneurônios inibitórios, inibindo-o, o que permite a excitação do RVLM e conseqüentemente uma maior atividade sináptica. (Campos et al, 2001; Horiuchi et al, 2004). Aparentemente a ação da APC depende do RVLM para causar alterações cardiovasculares, sendo que a inibição do RVLM bloqueia a resposta mediada pela APC, todavia, a inibição da APC não bloqueia ações cardiovasculares mediadas pelo RVLM. (Silva et al, 2001).

1.6.1.5 Núcleo Ambíguo (NA)

O NA está localizado na área bulbar ventrolateral, sendo composto de duas colunas longitudinais (dorsal e ventral). A coluna dorsal é dividida em uma formação compacta rostral, uma formação semi-compacta intermediária e uma formação reticulada caudal (Bieger e Hopkins, 1987). A coluna ventral também chamada de formação externa do NA contém neurônios pré-ganglionares parassimpáticos que inervam o coração e outras estruturas supradiaphragmáticas. (Bieger e Hopkins, 1987, Hophins e Armour, 1982; Kalia, 1981). Na formação externa do NA estão localizados pré-motoneurônios respiratórios bulboespinhais (Von Euler, 1979).

No NA também estão localizados neurônios motores que controlam as respostas cronotrópicas, inotrópicas e dromotrópicas negativas do coração (Massari et al. 1998). Esse dado é confirmado pelos estudos de Massari e de Gatti que ao realizar microinjeções de L-glutamato dentro de sub-regiões do NA de gatos, observaram uma intensa bradicardia e uma redução da velocidade de condução atrioventricular.

Assim como visto no NTS, diversos estudos mostram a participação de receptores de aminoácidos excitatórios na neurotransmissão para o NA e para o DMV (Willis et al. 1996, Chan et al, 1984, Izzo et al, 1993, Massari et al, 1995). A participação de neurotransmissores como acetilcolina, substancia P e encefalinas também já foram estudadas, sendo a microinjeção dos mesmos no NA capaz de prover bradicardia, mas as repostas são menores, mais lentas e de maior duração (Agarwal & Calaresu, 1991). A microinjeção de antagonista gabaérgicos, no NA, foi capaz de aumentar de forma significativa a frequência

de descarga destes neurônios, sugerindo a existência de impulsos gabaérgicos tonicamente ativos para estas células (Gilbey et al. 1984).

1.6.1.6 Núcleo Dorsal Motor do Vago (DMV)

Apesar da origem principalmente das fibras pré-ganglionares cardíacas vagais serem no NA, algumas fibras eferentes vagais partem do DMV (Kalia & Sullivan, 1982). A principal função do DMV parece estar relacionada com a regulação do trato gastrointestinal (Hsieh et al, 1998), porém uma pequena porção de seus neurônios projeta fibras eferentes vagais para o coração (Kalia & Sullivan, 1982; Loewy & Spyer, 1990; Cheng & Powley, 2000). Estudos demonstram o envolvimento do DMV com efeitos dromotrópicos negativos, porém a maioria dos efeitos dromotrópicos cardíacos tem origem no NA (Massari et al, 1995). Além disso foram observados neurônios pré-ganglionares cardíacos vagais com imunorreatividade para acetilcolina e alguns com atividade para a enzima óxido nítrico sintase no DMV (Takanaga et al, 2003).

1.6.2 Áreas supra-bulbares responsáveis pela regulação neural do sistema cardiovascular.

Estruturas supra-bulbares também participam da regulação da atividade cardiovascular através da modulação de centros bulbares (Hilton et al., 1966).

Participam dessa regulação estruturas do mesencefálicas, incluindo o complexo do núcleo parabraquial (Loewy, 1991), o núcleo de Kolliker-Füse (Loewy & Mckellar, 1980), a substância cinzenta periaquedutal (Pelosi et al., 2005), estruturas prosencefálicas incluindo o hipotálamo, o núcleo central da amígdala (Fukumori et al., 2004), além de estruturas do córtex cerebral (Resstel et al., 2005), como a área septal (Scopinho et al., 2006), e o núcleo do leito da estria terminal (Alves et al., 2007; Crestani et al., 2007). Porém a atuação principal dessas áreas não é a regulação do sistema cardiovascular. As áreas supra-bulbares atuam modulando o sistema cardiovascular quando são estimuladas, por exemplo, durante as reações de defesa do organismo, em situação de perigo (Kubo et al., 2002; Tavares e Corrêa, 2006; Resstel et al., 2008; Walker & Carrive, 2003). São de extrema importância na manutenção da atividade cardiovascular durante situações de risco.

Vários pesquisadores utilizam as microinjeções intracisternais para estudar a ação de várias substâncias em vários núcleos nas superfícies dorsal e ventral da medula oblonga (Pires et al, 1998; Jordan, 2004; Bogle et al, 1990)

1.7 Injeção intracisternal (IC)

A cisterna magna é uma dilatação do espaço subaracnóideo, contém grande quantidade de líquido, ocupa o espaço entre a face inferior do cerebelo e a face dorsal do bulbo. Continua-se caudalmente com o espaço subaracnóideo da medula e liga-se ao quarto ventrículo através de uma abertura mediana (Sproull, 1963; Dangelo & Fanttini, 2007). O líquido contido na cisterna magna se espalha rapidamente ao longo da superfície ventral do tronco cerebral. O fluxo responsável por este feito flui dos ventrículos laterais através do forame interventricular de Monro para o terceiro ventrículo. De lá, ele corre para o quarto ventrículo através do aqueduto cerebral de Sylvius e em seguida, através do forame de Magendie e Luschka para o espaço subaracnóideo, passando ventralmente em pontos da cisterna através da fossa interpenducular para a região ao redor do círculo de Willis, e continuando o seu sentido chegando às principais artérias cerebrais. Fluxo do líquido é influenciado principalmente pela sua produção em uma extremidade e sua absorção em outra. Porém outros fatores como a pulsação das artérias intracranianas que a cada sístole aumenta a pressão líquórica empurrando líquido de forma lenta, também contribui para a movimentação do líquido no sistema nervoso central (Pinna, 2000; Dangelo & Fanttini, 2007). Por esse motivo vários pesquisadores utilizam as microinjeções intracisternais para o acesso de várias substâncias em vários núcleos nas superfícies dorsal e ventral da medula oblonga (Pires et al, 1998; Jordan, 2004; Bogle et al, 1990) . Nesse trabalho escolhemos esta técnica com intuito de acessar de forma direta, rápida e segura regiões ventrais e dorsais do bulbo, que estão classicamente envolvidas no controle cardiorrespiratório. No entanto é importante realçar que tal procedimento não delimita de forma precisa as áreas a serem atingidas pelo mercúrio, mas como um trabalho inicial que visa avaliar as ações centrais do mercúrio, essa técnica é de grande confiabilidade e validade.

1.8 Justificativa

Os seres humanos estão expostos constantemente ao mercúrio, seja por fontes naturais ou provenientes de atividades humanas e como consequência desta exposição, os indivíduos podem apresentar efeitos neurotóxicos graves ou até morte. Diante de acidentes ocorridos decorrentes da intoxicação por mercúrio, os cientistas têm realizado pesquisas com a finalidade de esclarecer os mecanismos pelos quais o mercúrio age nos diversos órgãos e sistemas e a concentração capaz de causar alterações estruturais e funcionais no organismo.

Buscando contribuir com um melhor entendimento das ações do mercúrio, desenvolvemos uma pesquisa que visa investigar os mecanismos pelos quais este metal exerce efeito sobre as estruturas relacionadas com a regulação neural do sistema cardiorrespiratório, bem como a concentração de mercúrio necessária para ocasionar esses efeitos, fato este muito relevante como dado para estudo dos possíveis quadros clínicos resultantes da exposição dos pacientes a diferentes doses deste metal.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da injeção intracisternal do HgCl_2 no controle central dos sistemas cardiovascular e respiratório.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Quantificar os efeitos das diferentes doses de HgCl_2 intracisternal sobre os parâmetros cardiovasculares e respiratórios.
- 2- Avaliar a participação do sistema nervoso simpático nas alterações da regulação cardiovascular e respiratória induzida pela injeção intracisternal de HgCl_2 .
- 3- Avaliar a participação do sistema nervoso parassimpático nas alterações da regulação cardiovascular e respiratória induzida pela injeção intracisternal de HgCl_2 .

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Para realização dessa pesquisa foram utilizados ratos Wistar, machos, hígidos, com peso de 300 gramas, fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os ratos foram tratados com água tratada e alimento “ad libitum”. O controle de luminosidade era próximo às condições normais, com ciclo de 12 horas. Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as orientações para a investigação biomédica, como indicado pelas Sociedades Brasileira de Biologia Experimental e aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (CEUA-EMESCAM 003/2007).

3.2 Anestesia

No início do experimento cada animal foi introduzido em uma cuba de vidro (3 dm³) contendo algodão embebido com halotano (Cristália) para indução da anestesia por inalação. Depois da anestesia, os animais eram colocados em uma mesa cirúrgica, em decúbito dorsal, e mantidos a indução anestésica através de uma máscara feita com béquero de 125 ml revestido internamente com algodão embebido com halotano, que foi conservado nas narinas até que a veia femoral fosse canulada e então administrado anestésico geral intravenosamente (i.v).

Após a canulação da veia femoral, o béquero foi retirado e a anestesia mantida com uretana (ethyl carbamate – Sigma Chemical) na dose de 1,2 g/Kg de rato pela via endovenosa. A escolha desse anestésico foi devido ao fato do mesmo provocar uma pequena depressão dos reflexos cardiovasculares e respiratório do animal, mantendo um longo período de anestesia (Maggi & Meli, 1986). Durante a realização do experimento, sempre que necessário, eram administradas doses suplementadas de uretana para manutenção de um plano anestésico adequado.

3.3 Procedimentos Cirúrgicos

3.3.1 Canulação

Cada animal foi submetido a uma incisão cutânea de aproximadamente 8 mm, na linha mediana ventral da região inguinal esquerda, próximo a virilha do animal, com a finalidade de dissecar a veia e a artéria femoral.

Para a canulação da veia femoral, foi inserido um catéter de polietileno PE-50, preenchido com uretana (30%) acoplado a uma seringa de 1 ml. Posteriormente a artéria femoral foi canulada utilizando um catéter de polietileno (PE 50) preenchido com salina-heparina (Salina 0,9% e heparina 100:1/UI) acoplado a uma seringa de 1 ml.

3.3.2 Traqueostomia

Após canulação foi realizada a traqueostomia com uma cânula traqueal de polietileno com intuito de melhorar a ventilação pulmonar do animal durante a realização do experimento, além de permitir o registro da frequência respiratória.

Para a colocação da cânula traqueal, foi realizado uma incisão de aproximadamente 5 cm na linha mediana cervical, com exposição e afastamento dos músculos esterno-hioíde e tireo-hioíde, para visualização da traquéia. A incisão cirúrgica foi feita entre os anéis cartilaginosos da traquéia e em seguida foi inserido um tubo de polietileno com 0,2 mm de diâmetro interno e 6,0 cm de comprimento, interiorizando aproximadamente 1 cm de traquéia.

O registro de volumes respiratórios foi realizado através da conexão da cânula traqueal a um pneumatógrafo (Fleish 0000) ligado a um transdutor de baixa pressão (Validyne DP45) e um amplificador (Carrier Amplifier, Gould 20-4615), conectado ao polígrafo (Gould RS 3400).

3.3.3 Craneotomia

O último procedimento realizado foi a craneotomia na qual o animal é colocado em decúbito ventral na tábua cirúrgica de madeira, para a realização de uma incisão, no sentido ântero-posterior da linha mediana do crânio do animal com exposição da calota craniana e dos músculos esplênico da cabeça, semi-espinhal cefálico e trapézio. Esses eram dissecados com bisturi elétrico

(BM-250-Medcir) na porção mediana no sentido ântero-posterior para tornar possível a visualização da membrana atlanto occipital.

3.4 Estereotaxia

3.4.1 Posicionamento do animal

Os animais foram posicionados em decúbito ventral em um aparelho estereotático (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) proporcionando firme inserção e simetria bilateral ao crânio, com barra de fixação auricular colocada no meato auditivo externo e a barreira incisiva ajustada em -11, para injeção intracisternal.

3.4.2 Acesso a cisterna magna para injeções intracisternais

Fixado o crânio do animal no estereotático e após a craneotomia, visualizou-se a cisterna magna, localizada inferiormente ao osso occipital. As injeções intracisternais foram feitas com uma agulha Mizze introduzida na cisterna magna conectada a uma cânula de polietileno PE 10 preenchida com a solução a ser injetada, por uma microseringa de 10 μ l (Hamilton).

3.5 Temperatura Corporal

Durante todo o experimento, a temperatura corporal do animal foi mantida em $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por meio de uma manta térmica (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard), com o sensor (par termoeletrico) posicionado no reto do animal.

3.6 Registros Hemodinâmicos

A pressão arterial sistólica, diastólica e a pressão arterial média foram registradas através de uma cânula inserida na artéria femoral esquerda, ligada a um transdutor de pressão (Viggo-Spectramed, P 23 XL), conectada a um amplificador (Pressure Processor, Gould, 20-4615-526611). Os registros desses sinais foram feitos com um polígrafo de 4 canais (Gould RS 3400), previamente calibrado. A frequência cardíaca (FC) foi medida com um frequencímetro (Biotach, Gould 13-64615-66) a partir de onda de pulso de pressão arterial. Os registros da PAS, PAD, PAM e FC foram digitalizados

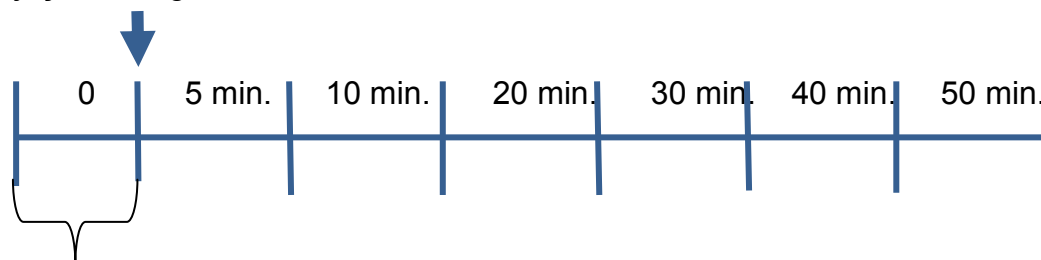
(Biopac MP 100) e armazenados no disco rígido de um computador para posterior análise.

3.7 Protocolos Experimentais

3.7.1 Aplicação de Cloreto de Mercúrio (0,62 $\mu\text{g/Kg}$, 1,2 $\mu\text{g/Kg}$, 2,4 $\mu\text{g/Kg}$, 60 $\mu\text{g/Kg}$ e 120 $\mu\text{g/Kg}$).

Para todos os experimentos esperou-se a estabilização hemodinâmica do animal. No quinto minuto após a estabilização injetou-se 5 μl de cloreto de mercúrio ou salina intracisternalmente com uma seringa Hamilton 10 microlitros em um período de um minuto. A coleta de dados foi realizada nos tempos 0 (imediatamente antes da injeção intracisternal), 5, 10, 20, 30, 40 e 50 minutos após a injeção intracisternal. Foram coletados dados para avaliar: pressão artéria sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média, frequência cardíaca e frequência respiratória.

Injeção de HgCl_2 / Salina

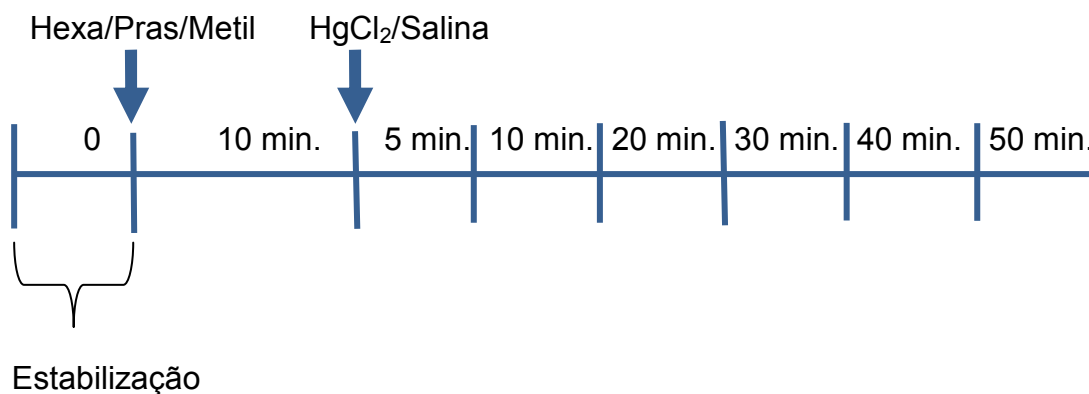


Estabilização

3.7.2 Injeção Intravenosa de Hidrocloreto de hexametônio, Cloridrato de Prazosin e Metilnitrato de atropina.

Cinco minutos após a estabilização dos parâmetros cardiorrespiratórios foi realizada a injeção intravenosa de Hidrocloreto de hexametônio (20 mg/Kg i.v) ou Cloridrato de prazosin (1 mg/Kg i.v) ou Metilnitrato de atropina (1 mg/Kg i.v) e após 10 minutos a injeção intracisternal 60 $\mu\text{g/Kg}$ de HgCl_2 . A coleta de dados foi feita nos tempos 0 (imediatamente antes da injeção intravenosa de Hidrocloreto de hexametônio ou Cloridrato de Prazosin ou Metilnitrato de

atropina), 10 minutos após injeção intravenosa de Hidrocloreto de hexametônio (Hexa), Cloridrato de prazosin (Pras) e Metilnitrato de atropina (Metil) e aos 5, 10, 20, 30, 40 e 50 minuto após a injeção intracisterna de 60 $\mu\text{g/Kg}$ de HgCl_2 .



3.8 Grupos Experimentais

A pesquisa foi realizada utilizando-se os seguintes grupos experimentais:

1. Grupo Controle ic (NaCl a 0,9%) (n:7)
2. Grupo HgCl_2 0,62 $\mu\text{g/Kg}$ ic (n:7)
3. Grupo HgCl_2 1,2 $\mu\text{g/Kg}$ ic (n:7)
4. Grupo HgCl_2 2,4 $\mu\text{g/Kg}$ ic (n:7)
5. Grupo HgCl_2 60 $\mu\text{g/Kg}$ ic (n:7)
6. Grupo HgCl_2 120 $\mu\text{g/Kg}$ ic (n:3)
7. Grupo Controle ic, Hidrocloreto de hexametônio iv (n:6)
8. Grupo 60 HgCl_2 ic, Hidrocloreto de hexametônio iv (n:6)
9. Grupo Controle ic, Cloridrato de prazosin iv (n:6)
10. Grupo 60 HgCl_2 ic, Cloridrato de prazosin iv (n:6)
11. Grupo Controle ic, Metilnitrato de atropina iv (n:6)
12. Grupo 60 HgCl_2 ic, Metilnitrato de atropina iv (n:6)

3.9. Análise Estatística

Os resultados foram expressos com média \pm erro-padrão da média (EPM). A estatística utilizada foi Análise de Variância (ANOVA) 2 vias para medidas repetidas. Quando a ANOVA apresentava significância estatística, o teste *post-hoc* de Bonferroni era realizado para comparação entre as médias. O nível de significância adotado foi de 5%.

3.10 Drogas Utilizadas

Foram utilizadas para injeção intracisternal.

1. NaCl a 0,9% (Vetec) como controle
2. Cloreto de mercúrio (Sigma) em dose de 0,62 $\mu\text{g/Kg}$; 1,2 $\mu\text{g/Kg}$; 2,4 $\mu\text{g/Kg}$; 60 $\mu\text{g/Kg}$ e 120 $\mu\text{g/Kg}$ dissolvida em NaCl 0,9% e administrada em um volume de injeção de 5 μL .
3. Uretana (ethyl carbamate – Sigma Chemical)
4. Halotano (Cristália)
5. Hidroclorato de hexametônio (Sigma)
6. Cloridrato de prazosin (Sigma)
7. Metilnitrato de atropina (Sigma)

As drogas só eram administradas quando o animal apresentava parâmetros cardiorrespiratórios estáveis.

IV RESULTADOS

4.1 Avaliações das alterações cardiorrespiratórias induzidas por injeções intracisternais de salina e 0,68; 1,2 e 2,4 $\mu\text{g/Kg}$ de HgCl_2 .

Ao avaliarmos o efeito da administração intracisternal de salina e 0,68, 1,2 e 2,4 $\mu\text{g/Kg}$ de cloreto de mercúrio observamos que não houve alterações significativas ($p>0,05$) nos parâmetros cardiorrespiratórios dos grupos Controle e Mercúrio.

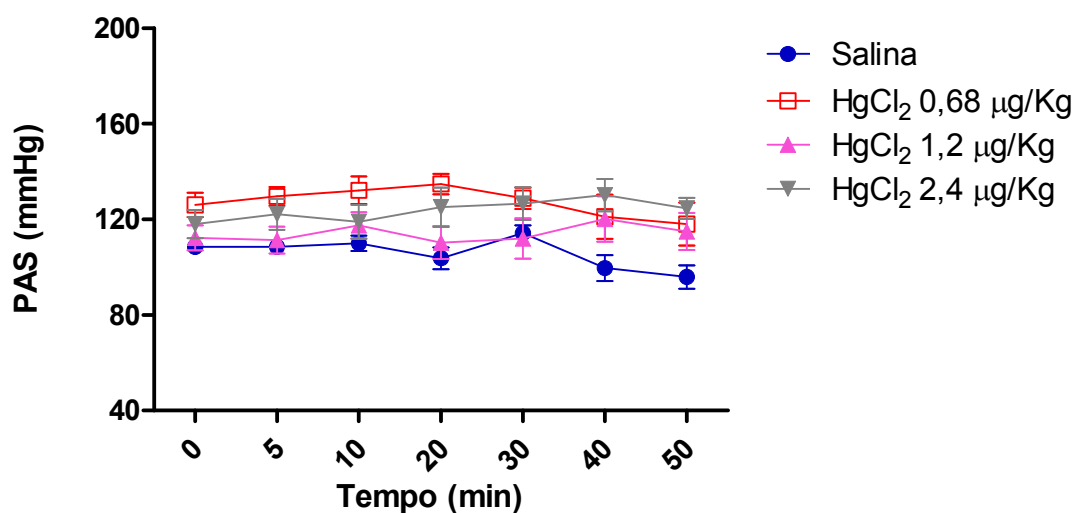


Figura 1: Valores de pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após injeção intracisternal de 0,68; 1,2 e 2,4 $\mu\text{g/Kg}$. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias) $p>0,05$.

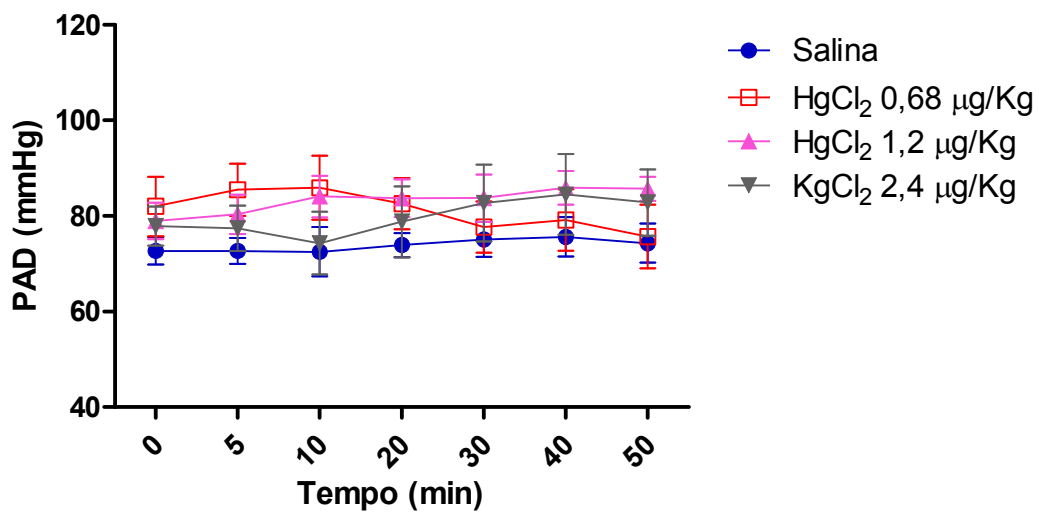


Figura 2: Valores de pressão arterial diastólica (PAD) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após injeção intracisternal de 0,68; 1,2 e 2,4 µg/Kg. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA (duas vias) $p > 0,05$.

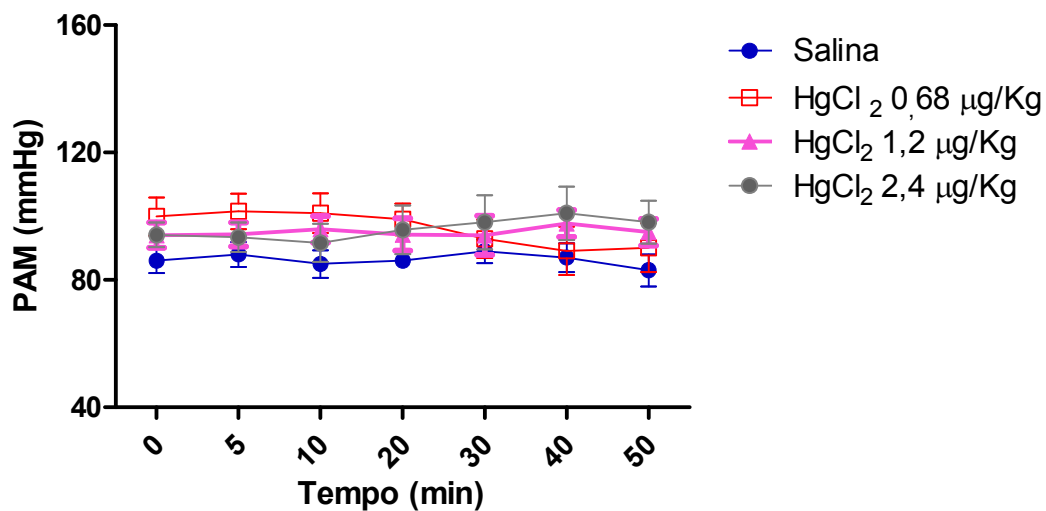


Figura 3: Valores de pressão arterial média (PAM) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após injeção intracisternal de 0,68; 1,2 e 2,4 µg/Kg. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA (duas vias) $p > 0,05$.

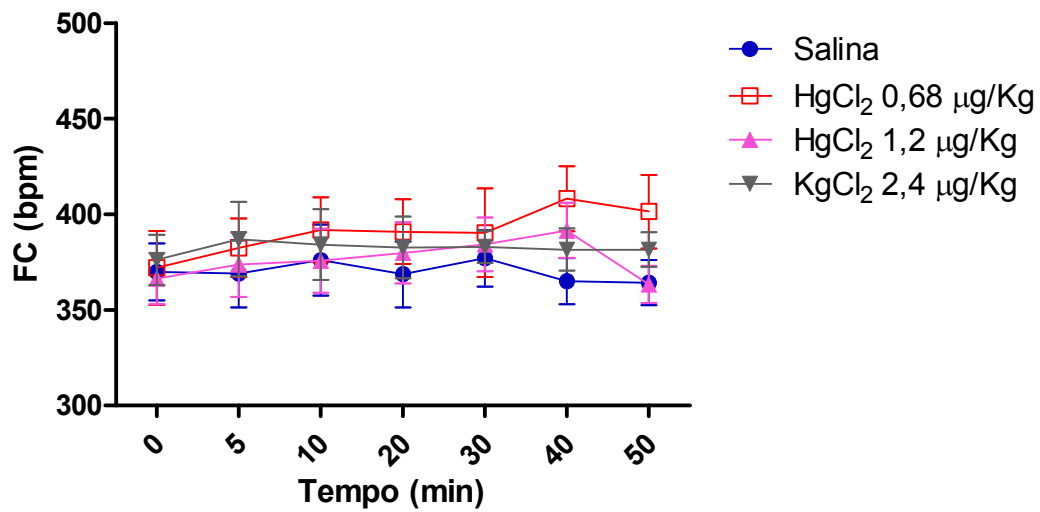


Figura 4: Valores de frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após injeção intracisterna de 0,68, 1,2 e 2,4 µg/Kg. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA (duas vias) $p > 0,05$.

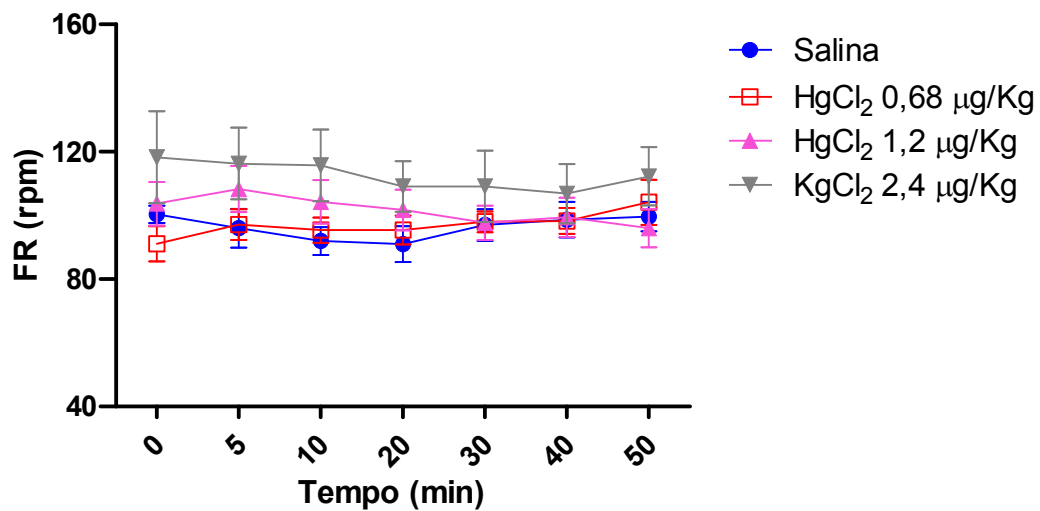


Figura 5: Valores de frequência respiratória (FR) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após injeção intracisterna de 0,68; 1,2 e 2,4 µg/Kg. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA (duas vias) $p > 0,05$.

4.2 Avaliações das alterações cardiorrespiratórias induzidas por injeções intracisternais de 60 µg/Kg de HgCl₂

Ao avaliarmos o efeito da administração de 60 µg/Kg cloreto de mercúrio observamos elevação significativa ($p < 0,05$) da PAS, PAD, PAM e redução da FR.

Tabela 1

Efeitos da administração de prazosin nos grupos controle e mercúrio (60µg/kg).

		0 min	Hexa	5 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
PAS	Ct	88,89±4	57,14±1	56,63±1	57,44±3	50,79±3	49,91±3	50,98±4	53,13±4
(mmHg)	HgCl ₂	120,62±5	93,03±3	92,30±2	99,29±3	104,14±3	108,64±6	94,03±9	62,00±3
PAD	Ct	119,36±6	83,95±3	83,72±3	81,35±4	76,16±5	79,34±6	80,08±7	82,48±8
(mmHg)	HgCl ₂	88,33±4	61,40±3	62,71±2	68,75±2	68,09±3	70,98±5	59,82±8	39,19±4
PAM	Ct	102,94±5	65,62±2	66,98±2	66,71±3	59,96±4	60,09±4	60,21±4	62,43±5
(mmHg)	HgCl ₂	105,67±4	73,87±3	75,36±2	80,79±2	79,65±4	82,68±6	67,96±8	44,23±4
FC	Ct	398,60±13	375,89±19	363,27±19	370,76±16	358,49±17	347,28±13	378,11±13	390,22±18
(bpm)	HgCl ₂	384,16±14	381,85±20	388,91±20	404,79±17	486,78±32	536,08±35	572,73±34	555,97±35
FR	Ct	98,4±5	87,2±5	97,2±6	98,4±6	91,6±7	89,6±6	99,6±7	97,2±6
(rpm)	HgCl ₂	103,2±5	109,2±6	129,6±10	135,6±11	124,8±9	124,8±10	128,4±11	98,4±8

Tabela 1: Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória de ratos controle e mercúrio. Os resultados foram expressos em média ± EPM, ANOVA 2 vias para medidas repetidas (*Post-Hoc Bonferroni*). $p < 0,05$.

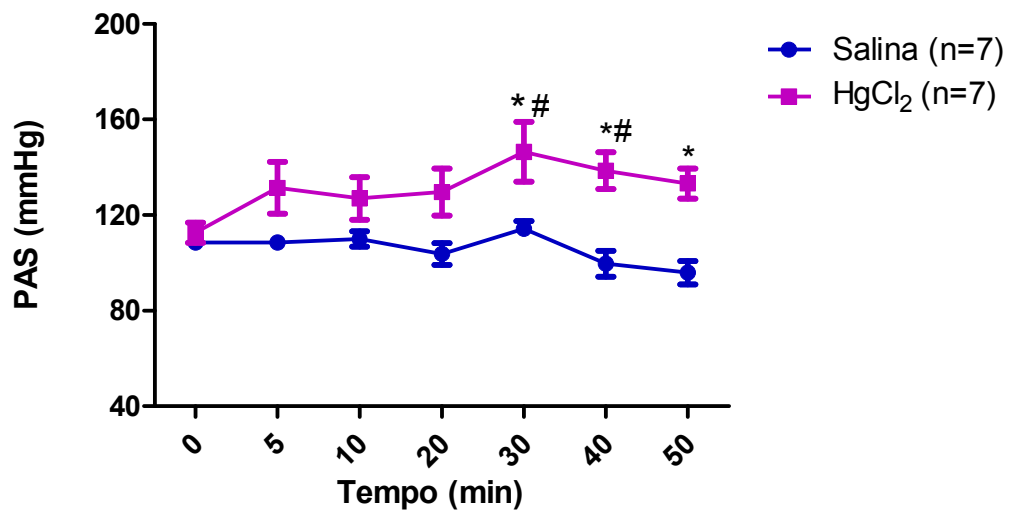


Figura 6: Valores de pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após injeção intracisterna de salina e mercúrio 60 μ g/Kg. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; # antes vs. após injeção de mercúrio.

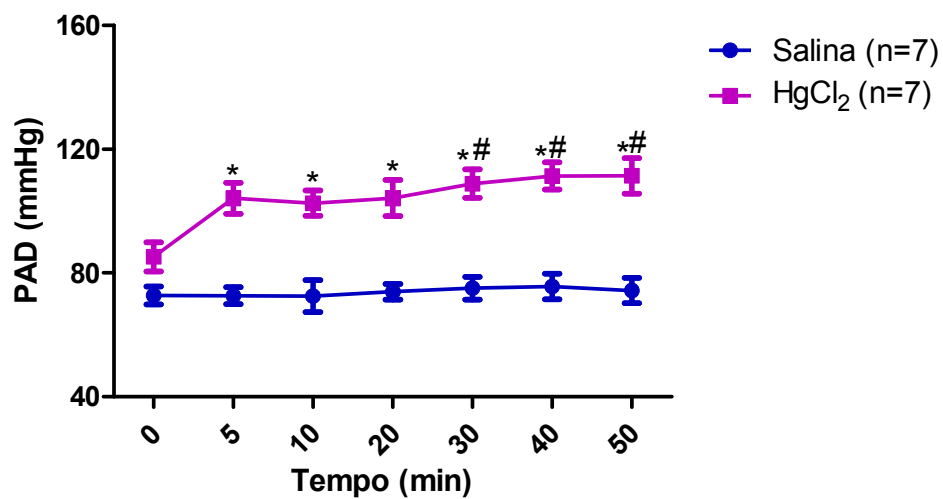


Figura 7: Valores de pressão arterial diastólica (PAD) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após injeção intracisterna de salina e mercúrio 60 μ g/Kg. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; # antes vs. após injeção de mercúrio.

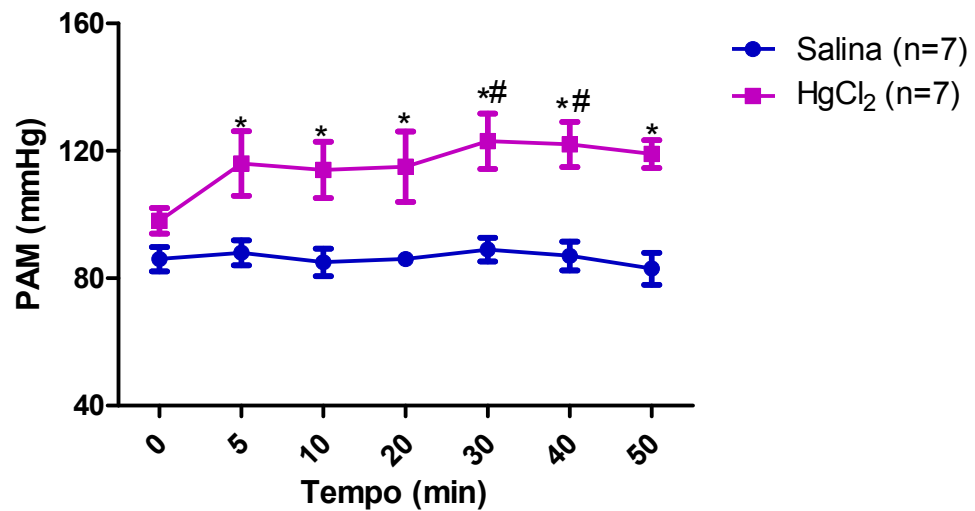


Figura 8: Valores de pressão arterial média (PAM) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina e mercúrio 60 μ g/Kg. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; # antes vs. após injeção de mercúrio.

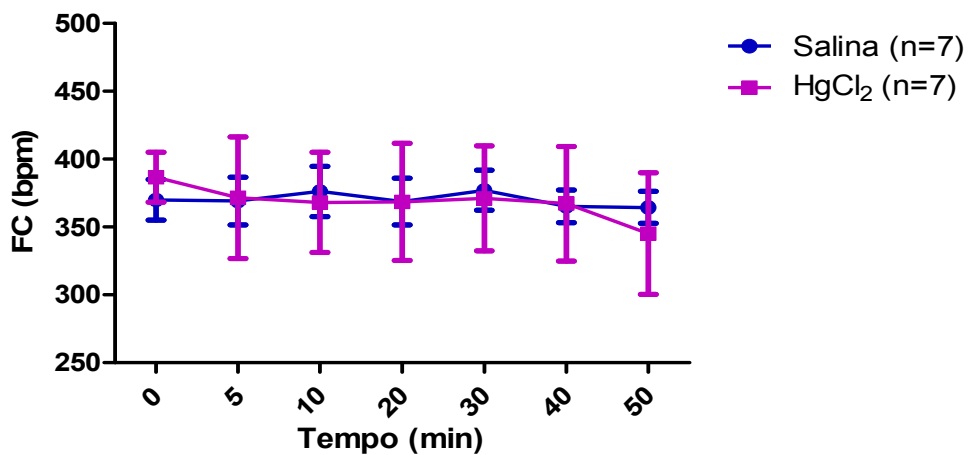


Figura 9: Valores de frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina e mercúrio 60 μ g/Kg. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias) $p > 0,05$.

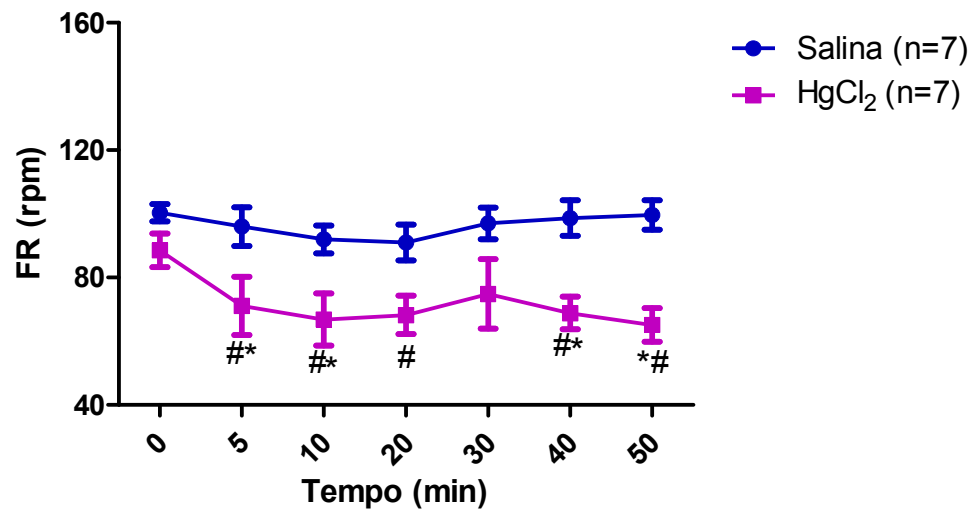


Figura 10: Valores de frequência respiratória (FR) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após injeção intracisternal de salina e mercúrio 60 μ g/Kg. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; # antes vs. após injeção de mercúrio.

4.3 Avaliações do comportamento cardiorrespiratório da injeção intracisternal de Hgcl₂ 120 µg/Kg

Os ratos que receberam injeção intracisternal de cloreto de mercúrio na dose de 120 µg/Kg morreram devido à parada cardiorrespiratória.

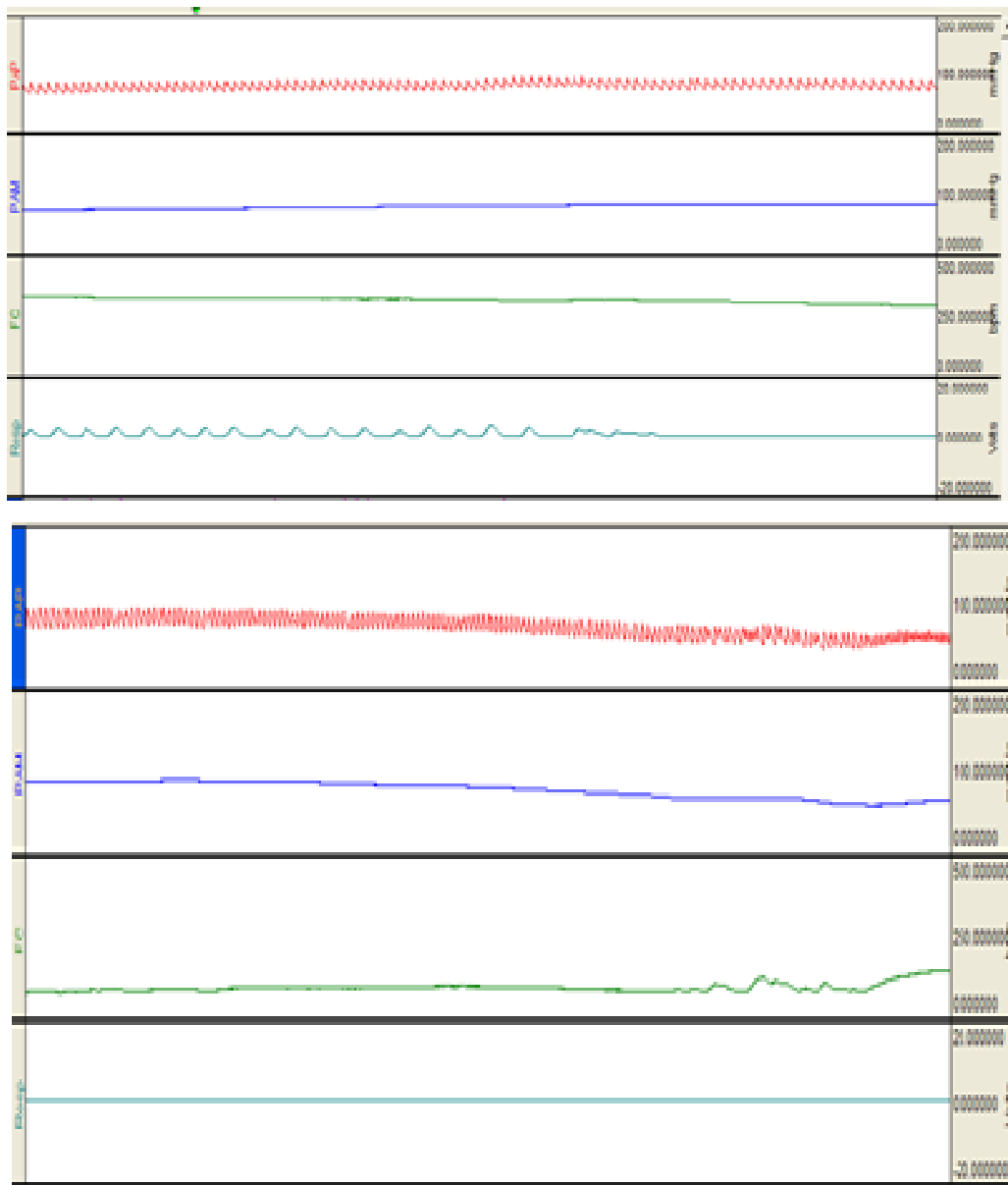


Figura 11: Alterações cardiorrespiratórias do grupo Mercúrio, antes e após injeção intracisternal de mercúrio na dose de 120 µg/Kg.

4.4 Avaliações da participação do sistema nervoso autônomo nas alterações cardiorrespiratórias induzidas pela injeção intracisternal de 60 $\mu\text{g/Kg}$ de HgCl_2

As figuras 12, 13 e 14 mostram os efeitos da administração de salina e de mercúrio antes e após o bloqueio ganglionar com hexametônio. Tanto no grupo Controle como no grupo Mercúrio o hexametônio reduziu significativamente ($p < 0,05$) a PAS, PAD e PAM. Estas por sua vez, não foram alteradas após administração de salina e cloreto de mercúrio 60 $\mu\text{g/Kg}$. A FC e FR não alteraram de forma significativa após a injeção de hexametônio, salina ou cloreto de mercúrio 60 $\mu\text{g/Kg}$.

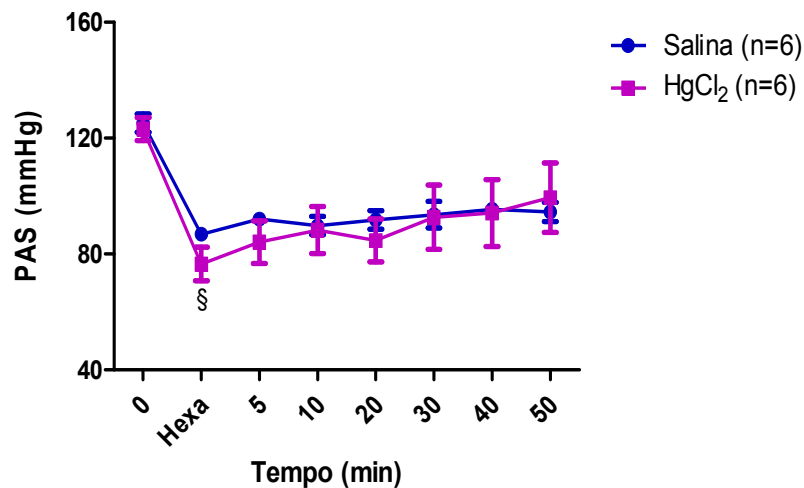


Figura 12: Valores de pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após bloqueio ganglionar (hidroclorato de hexametônio 20 mg/Kg.) e injeção intracisternal de salina ou 60 $\mu\text{g/Kg}$ de HgCl_2 . Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; § antes vs. após injeção de hexametônio; # antes vs. após injeção de mercúrio.

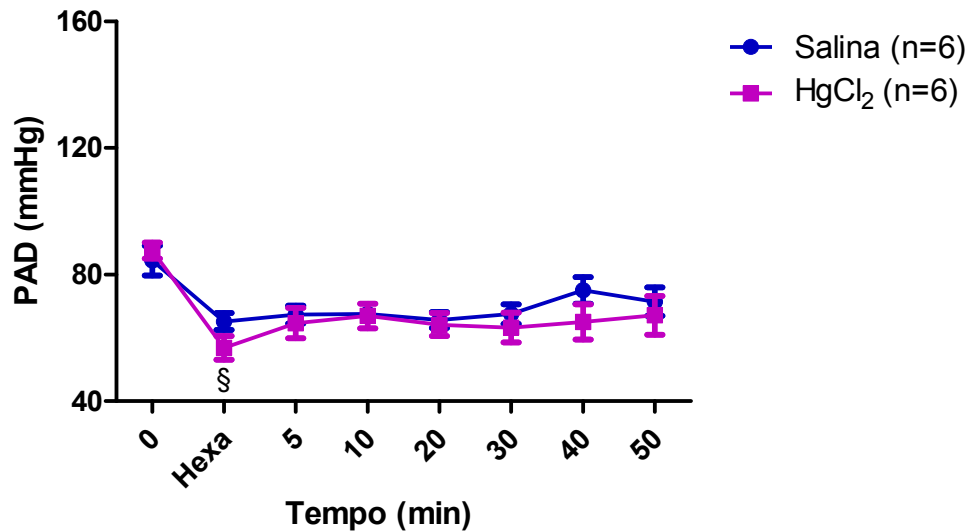


Figura 13: Valores de pressão arterial diastólica (PAD) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após bloqueio ganglionar (hidroclorato de hexametônio 20 mg/Kg.) e injeção intracisterna de salina ou 60 μ g/Kg de HgCl₂. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; § antes vs. após injeção de hexametônio; # antes vs. após injeção de mercúrio.

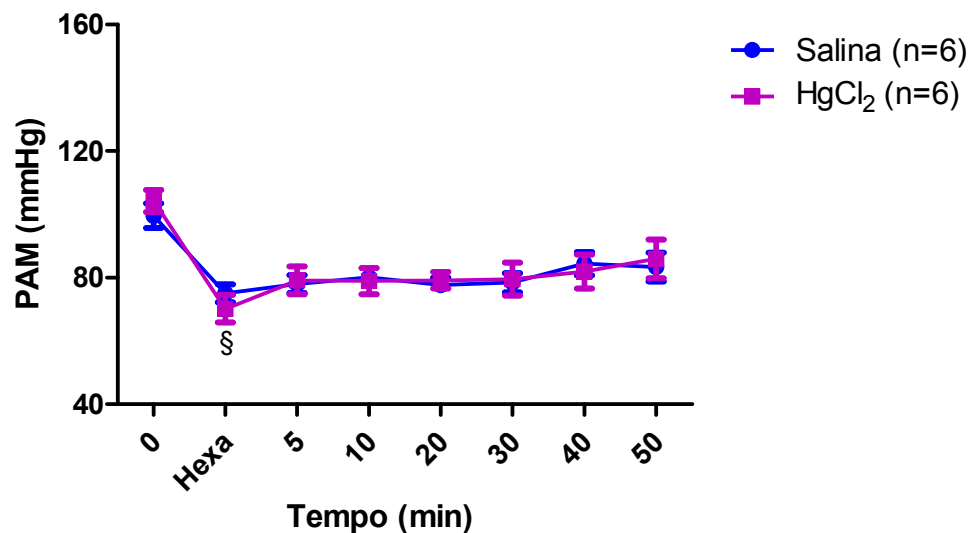


Figura 14: Valores de pressão arterial média (PAM) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após bloqueio ganglionar (hidroclorato de hexametônio 20 mg/Kg.) e injeção intracisterna de salina ou 60 μ g/Kg de HgCl₂. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; § antes vs. após injeção de hexametônio; # antes vs. após injeção de mercúrio.

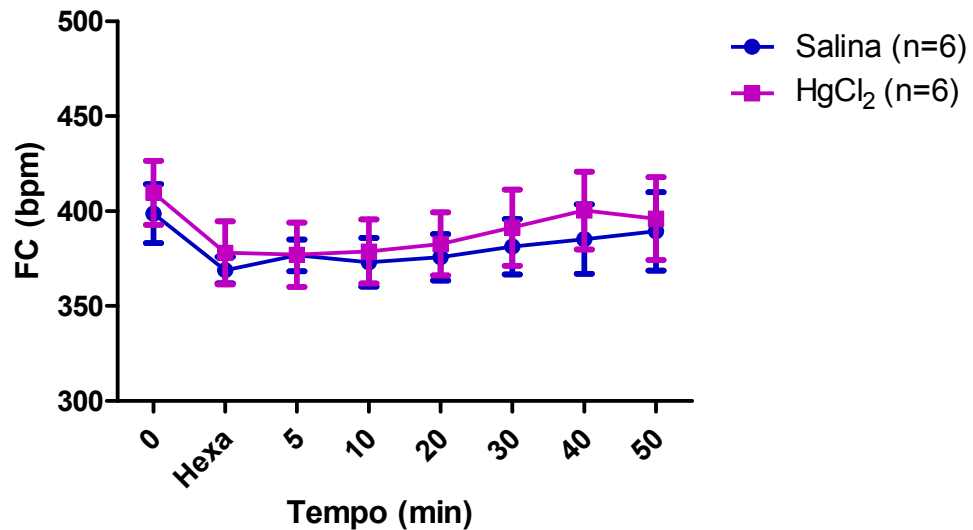


Figura 15: Valores de frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após bloqueio ganglionar (hidroclorato de hexametônio 20 mg/Kg.) e injeção intracisternal de salina ou 60 μ g/Kg de HgCl₂. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; § antes vs. após injeção de hexametônio; # antes vs. após injeção de mercúrio.

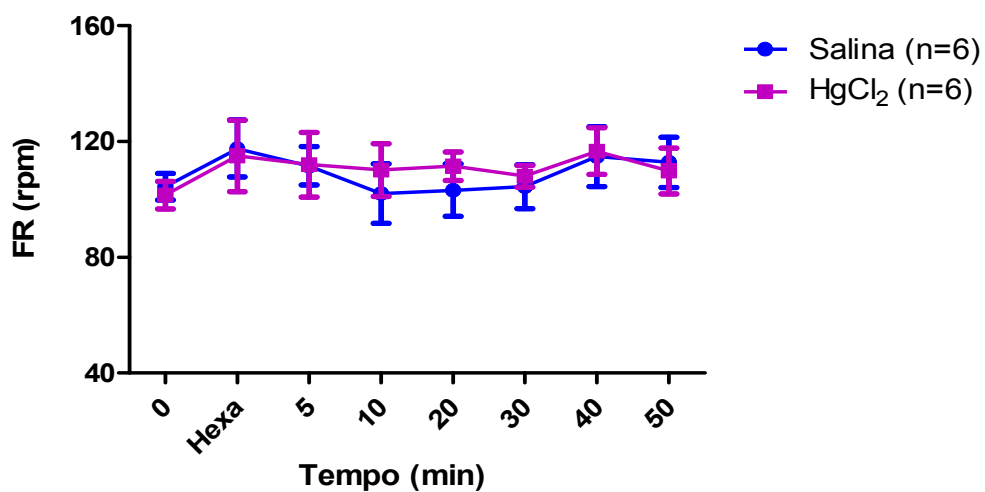


Figura 16: Valores da frequência respiratória (FR) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após bloqueio ganglionar (hidroclorato de hexametônio 20 mg/Kg.) e injeção intracisternal de salina ou 60 μ g/Kg de HgCl₂. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; § antes vs. após injeção de hexametônio; # antes vs. após injeção de mercúrio.

4.5 Avaliações da participação do sistema nervoso simpático nas alterações cardiorrespiratórias induzidas pela injeção intracisternal de HgCl₂ 60 µg/Kg

Ao avaliarmos o efeito da administração de salina e 60 µg/Kg cloreto de mercúrio após a inibição de receptores α_1 -adrenérgicos observamos redução da PAS, PAD e PAM após injeção intravenosa de prazosin sem alteração da FC, além de elevação significativa ($p < 0,05$) da PAS aos 20 (CT: $76,1 \pm 5,5$ e HgCl₂: $104,1 \pm 3,7$ mmHg) e 30 (CT: $99,3 \pm 6,6$ e HgCl₂: $108,6 \pm 6,7$ mmHg) minuto, PAD aos 20 (CT: $50,8 \pm 3,1$ e HgCl₂: $68,1 \pm 3,6$ mmHg) e 30 (CT: $49,9 \pm 3,3$ e HgCl₂: $71 \pm 5,6$ mmHg) minuto, PAM aos 20 (CT: 60 ± 4 e HgCl₂: $79,7 \pm 4,1$ mmHg) e 30 (CT: $60 \pm 4,4$ e HgCl₂: $82,7 \pm 5,8$ mmHg) minutos, FR aos 5 (CT: $97,2 \pm 6,1$ e HgCl₂: $129,6 \pm 10,8$ rpm), 10 (CT: $98,4 \pm 6,7$ e HgCl₂: $135,6 \pm 11,5$ rpm), 20 (CT: $91,6 \pm 7,6$ e HgCl₂: $124,8 \pm 9,6$ rpm) e 30 (CT: $89,6 \pm 6,7$ e HgCl₂: $124,8 \pm 10,7$ rpm) minutos somente na comparação entre grupos e elevação da FC aos 20 (CT: $358,5 \pm 17,1$ e HgCl₂: $386,8 \pm 32$ bpm), 30 (CT: $347,3 \pm 13,2$ e HgCl₂: $536,1 \pm 35,8$ bpm), 40 (CT: $378,1 \pm 13,3$ e HgCl₂: $572,7 \pm 34,2$ bpm) e 50 (CT: $390,2 \pm 18,2$ e HgCl₂: $556 \pm 35,4$) minutos na comparação entre grupos e intra grupos após injeção intracisternal de mercúrio.

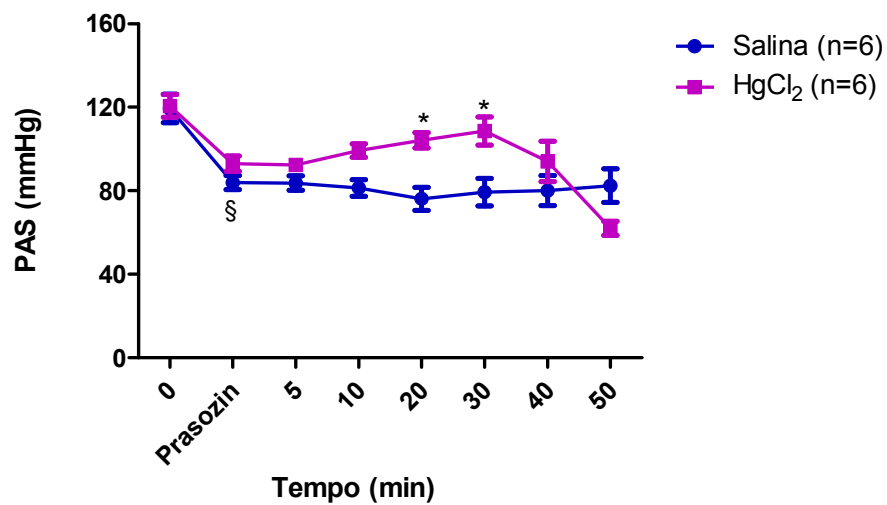


Figura 17: Valores de pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 (cloridrato de prazosin 1mg/kg.) e injeção intracisterna de salina e mercúrio 60 µg/Kg. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; § antes vs. após injeção de prazosin; # antes vs. após injeção de mercúrio.

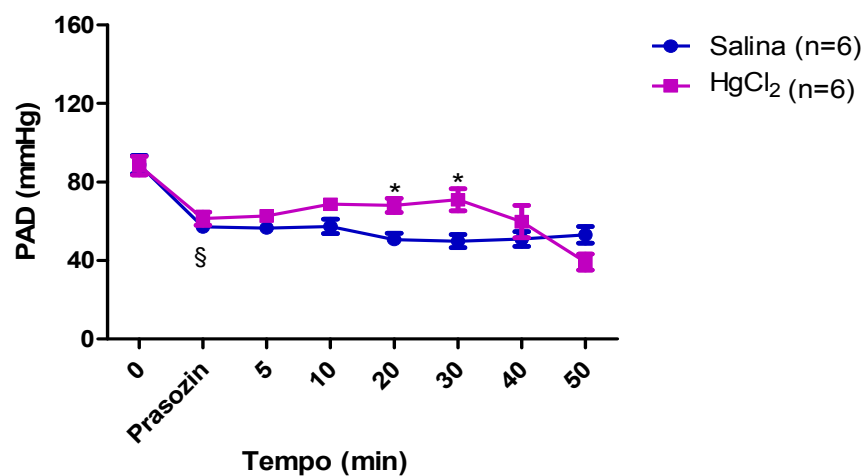


Figura 18: Valores de pressão arterial diastólica (PAD) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 (cloridrato de prazosin 1mg/kg.) e injeção intracisterna de salina e mercúrio 60 µg/Kg. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; § antes vs. após injeção de prazosin; # antes vs. após injeção de mercúrio.

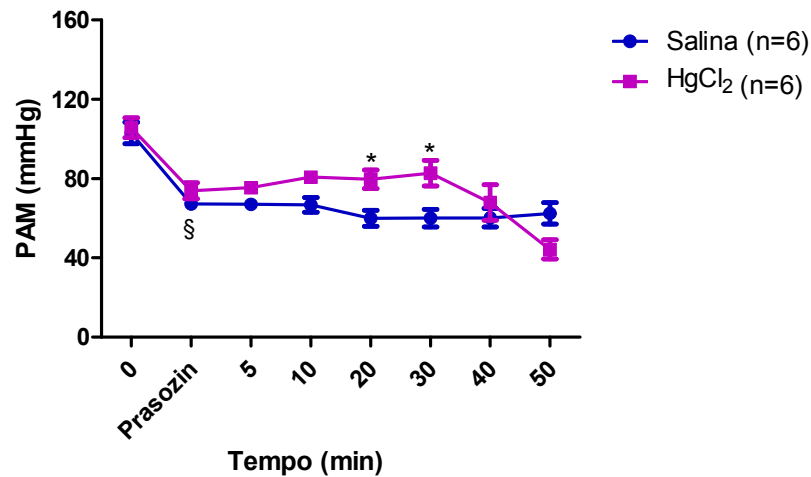


Figura 19: Valores de pressão arterial média (PAM) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 (cloridrato de prazosin 1mg/kg.) e injeção intracisterna salina e mercúrio 60 µg/Kg. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; § antes vs. após injeção de prazosin; # antes vs. após injeção de mercúrio.

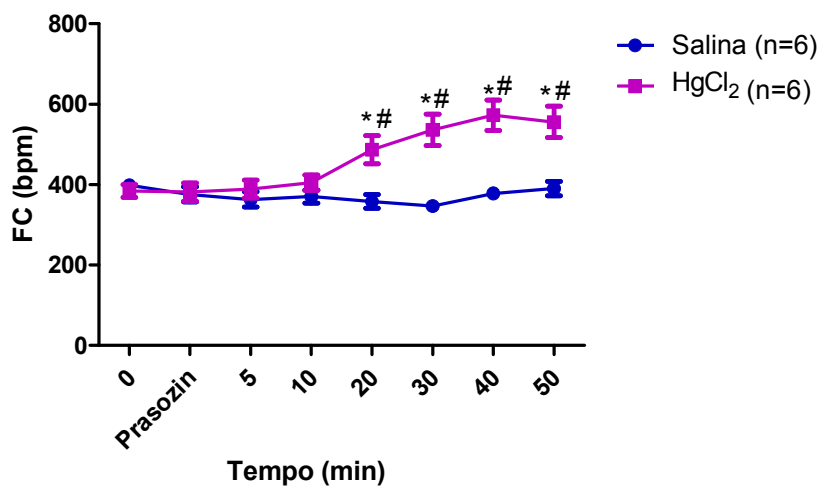


Figura 20: Valores de frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 (cloridrato de prazosin 1mg/kg.) e injeção intracisterna salina e mercúrio 60 µg/Kg. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; § antes vs. após injeção de prazosin; # antes vs. após injeção de mercúrio.

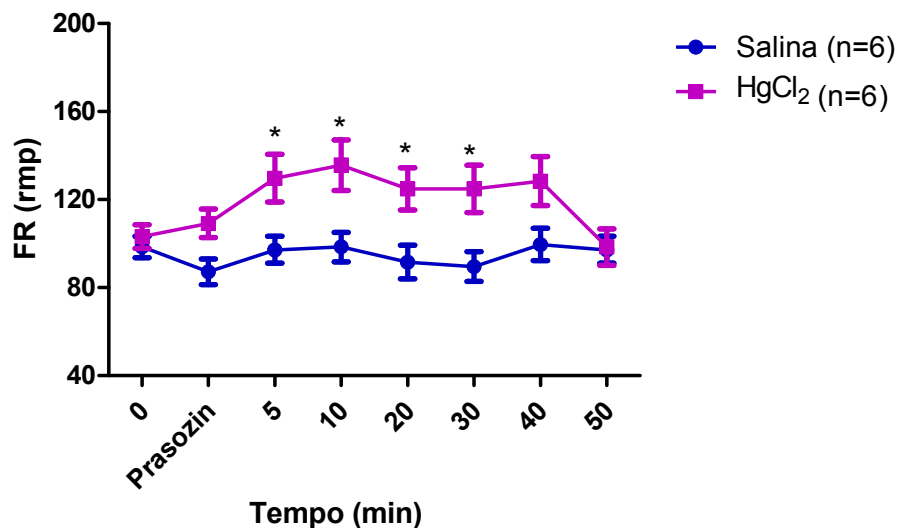


Figura 21: Valores de frequência respiratória (FR) dos grupos Controle e Mercúrio antes e após bloqueio de receptor alfa-1 (cloridrato de prazosin 1mg/kg.) e injeção intracisternal de salina e mercúrio 60 µg/Kg. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA (duas vias). $p < 0,05$: * Controle vs. Mercúrio; § antes vs. após injeção de prazosin; # antes vs. após injeção de mercúrio.

4.6 Avaliações da participação do sistema nervoso parassimpático nas alterações cardiorrespiratórias induzidas pela injeção intracisternal de HgCl₂ 60 µg/Kg

Na figura 22 mostram os efeitos da injeção intracisternal de cloreto de mercúrio 60 µg/Kg após bloqueio de receptores muscarínicos realizado por injeção intravenosa de metilnitrato de atropina (antagonista muscarínico).

Após injeção intravenosa de metilatropina os ratos apresentaram elevação da frequência cardíaca e discreta elevação da pressão arterial, quando realizado a injeção intracisternal de cloreto de mercúrio na dose de 60 µg/Kg ocorreu apnéia associada à hipotensão arterial culminando com parada cardiorrespiratória dos ratos, o mesmo não aconteceu quando foi realizada a injeção intravenosa de metilnitrato de atropina com posterior injeção intracisternal de salina.

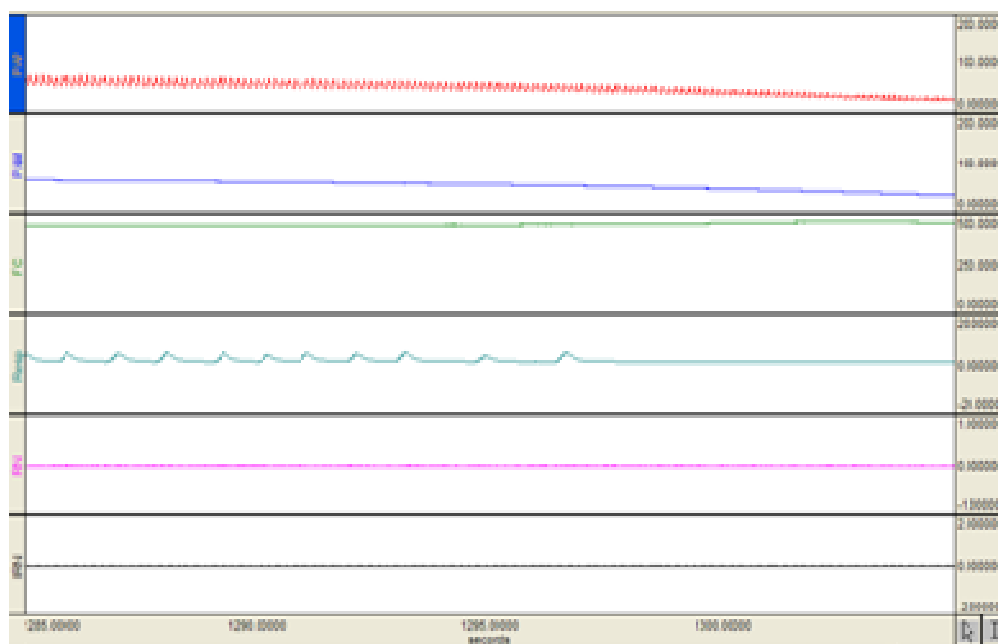
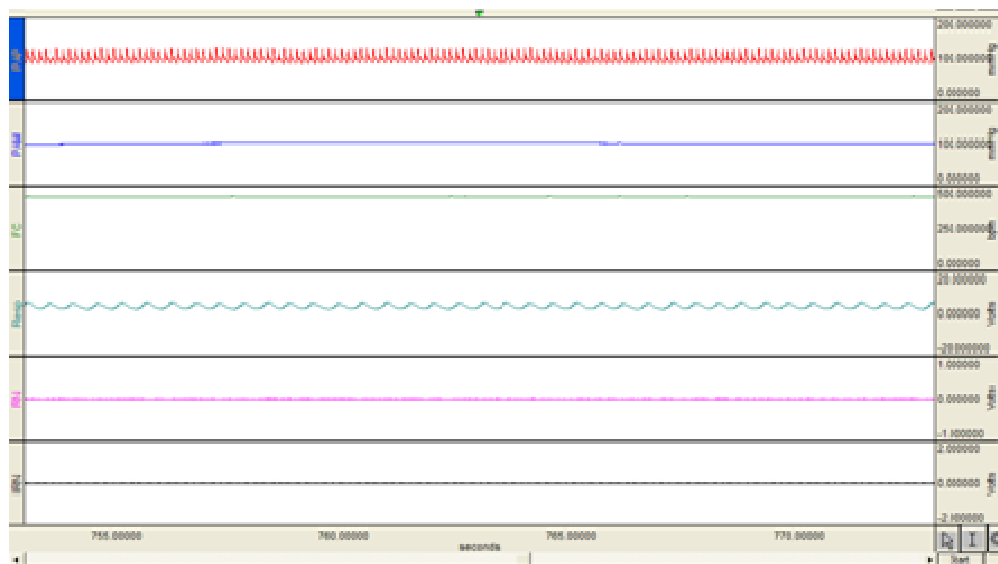


Figura 22: Alterações cardiorrespiratórias do grupo Mercúrio, após injeção intravenosa de metilnitrato de atropina (1mg/Kg), antes e depois da injeção intracisternal de mercúrio na dose de 60 μ g/Kg.

V DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que microinjeções intracisternais de HgCl_2 induzem alterações no controle cardiorrespiratório como aumento da PAS, PAD e PAM e redução da FR. Nossos resultados também demonstram o envolvimento do sistema nervoso autônomo nessas respostas. Sabe-se que microinjeções intracisternais permitem o acesso de fármacos e outras substâncias a vários núcleos das superfícies dorsais e ventrais da medula (Sproull, 1963), onde se situam núcleos e estruturas envolvidas com o controle cardiorrespiratório. Por esse motivo é razoável inferir que nossos resultados são consequência dos efeitos de HgCl_2 nestas áreas, no entanto, a técnica empregada não nos permite delimitar com precisão o sítio de ação.

Até o presente momento, não existem estudos evidenciando alterações cardiorrespiratórias decorrentes da microinjeção intracisternal de cloreto de mercúrio no sistema nervoso central. Diante da carência de estudos nesta área, nossa discussão será embasada em hipóteses calcadas nas alterações dos parâmetros fisiológicos observados.

5.1 Efeitos da injeção intracisternal de HgCl_2 no sistema cardiorrespiratório

Em nossos estudos, observamos que injeção intracisternal de HgCl_2 provoca ativação do sistema nervoso autônomo e como consequência aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e média com redução simultânea da frequência respiratória, sendo essas alterações dose-dependentes. Em doses menores 0,68; 1,2 e 2,4 $\mu\text{g/Kg}$ não obtivemos respostas e na dose de 60 $\mu\text{g/Kg}$ obtivemos alteração de todos os parâmetros exceto da FC. A dose 120 $\mu\text{g/Kg}$ de cloreto de mercúrio desencadeou o óbito dos ratos por parada cardiorrespiratória, sendo então uma dose com potente efeito neurotóxico sobre o sistema nervoso central. Diante disso resolvemos estudar as possíveis causas dessas alterações, na dose de 60 $\mu\text{g/Kg}$,

postulando mecanismos que justifiquem o aumento da PAS, PAD, PAM e redução da FR.

Tem sido descrito na literatura (Brookes, 1992 e Aschner *et al.*, 2000) a capacidade do metilmercúrio em inibir a recaptação do glutamato, promovendo aumento dos níveis deste mediador químico e da estimulação glutamatérgica no sistema nervoso central, o que pode levar à morte celular e neurodegeneração. Estes dados nos levam a postular a possibilidade de que parte de nossos resultados sejam dependentes da ativação de núcleos da superfície ventral bulbar dentre eles o RVLM. Esta região é facilmente acessada pelas injeções intracisternais, e como consequência a estimulação do RVLM, temos a excitação de neurônios pré-motores simpáticos na IML (Coluna intermédia lateral). Propomos que estes efeitos sejam devidos primariamente ao aumento da concentração de glutamato no RVLM. Este mecanismo ocasionaria um aumento da atividade simpática com conseqüente aumento da PAS, PAD e PAM.

No estudo de Huang e Narahash, (1996) realizado em neurônios do gânglio da raiz dorsal, foi observada a existência de um grupo sulfidril nos quais mercúrio se liga, acarretando uma ativação da proteína G inibitória e assim abertura de canais para íons cloro. É bem conhecida e aceita a afinidade do cloreto de mercúrio com o grupo sulfidril (Webb, 1966) e a participação do grupo sulfidril na modulação dos receptores NMDA. (Aizenman *et al.*, 1989; Lazarewicz *et al.* 1989). Com base no estudo de Huang e Narahash (1996) postulamos que parte dos efeitos cardiovasculares do cloreto de mercúrio possam também ser mediados por inibição do NTS através da estimulação de receptores GABA_A com conseqüente ativação da proteína Gi e abertura de canais para íon cloreto, levando então a não estimulação do CVLM e com isso liberação do RVLM com conseqüente aumento da PAS, PAD e PAM.

A existência de mecanismos que atuam na frequência cardíaca de forma antagônica pode ter sido responsável pela inalteração da FC.

Nos estudos de Massari *et al.*, 1995 e Gatti *et al.*, 1996, realizados em gatos, a microinjeção de L-glutamto dentro de sub-regiões do núcleo ambíguo (NA) promoveu intensa bradicardia. No estudo de Chistravanshi *et al.*, 1991 o qual realizou microinjeção de glicina dentro do NA, obteve como resposta um aumento significativo da FC basal. Com isso, a ativação ou inibição de

diferentes regiões e receptores no NA pode ter sido responsável pela anulação da possível alteração da FC ocasionada por microinjeção intracisterna de cloreto de mercúrio, demonstrando a variabilidade da FC.

As injeções intracisternais também acessam núcleos da superfície dorsal que estão envolvidos com o controle respiratório. A depressão respiratória encontrada após a injeção intracisterna de HgCl_2 pode ser resultante de mecanismos reflexos ou mesmo de outros mecanismos intrínsecos do HgCl_2 sobre neurônios específicos. Dentre os mecanismos postulados, sugerimos a possibilidade de ações mediadas por proteína G inibitória e canais para cloreto. Lembramos que a excitabilidade e a circuitaria de controle autonômico e respiratório são diversas e com propriedades específicas, que muitas vezes apresentam efeitos antagônicos para um mesmo estímulo.

Outra justificativa para redução da FR seria o aumento do fluxo sanguíneo para os pulmões e para os tecidos, decorrente do aumento da pressão arterial. A melhora da perfusão tecidual e a troca gasosa reduziram então, os níveis de CO_2 na circulação sanguínea com consequente redução da frequência respiratória.

A dose $120\mu\text{g/Kg}$ de cloreto de mercúrio desencadeou o óbito dos ratos por parada cardiorrespiratória, sendo então uma dose com potente efeito neurotóxico sobre o sistema nervoso central.

5.2 Participação do sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático) nas alterações cardiorrespiratórias induzidas pela injeção intracisterna de HgCl_2

Após o bloqueio ganglionar com hexametônio todas as alterações desencadeadas por $60\mu\text{g/Kg}$ de cloreto de mercúrio desapareceram, confirmando a participação do sistema nervoso autônomo nas respostas cardiorrespiratórias. Porém a injeção de hexametônio não esclarece qual a divisão do sistema (simpático e/ou parassimpático) responsável pelas respostas, necessitando da realização de um bloqueio específico.

Para avaliação da participação simpática utilizamos um antagonista de receptor- α_1 (prazosin). Após realização do bloqueio de receptores α_1

observamos que o aumento pressórico induzido pela injeção intracisternal de 60 $\mu\text{g/Kg}$ de HgCl_2 foi abolido e houve aumento da FR. Porém quando comparamos o grupo Controle Prazosin com o grupo Mercúrio Prazosin, observamos aumento da PAS, PAD, PAM e FC no grupo Mercúrio Prazosin.

Sugerimos que o aumento pressórico do grupo Mercúrio quando comparado ao grupo Controle, seja decorrente do aumento da frequência cardíaca, que possivelmente elevou o débito cardíaco e consequentemente a pressão arterial. A elevação da frequência cardíaca pode ser decorrente da ação direta do sistema nervoso simpático no nodo sino atrial ou por ativação de receptores β_1 - adrenérgicos cardíacos por adrenalina circulante originada das terminações pós-sinápticas e da glândula supra-renal, já que os receptores alfa-adrenérgicos estão bloqueados. Porém, a estimulação simpática pelo mercúrio continua ocorrendo, tendo como consequência um aumento da noradrenalina circulante. Essa por sua vez, ao ativar receptores β_1 - adrenérgicos, aumentaria a FC, VS (volume de ejeção) e como consequência a pressão arterial.

Sustentando a hipótese da hiperpolarização ocasionada por ativação de receptores GABA pelo mercúrio no NTS, não é provável que a elevação da FC seja por ativação do barorreflexo decorrente da queda de pressão arterial provocada pela inibição de receptor- α_1 , pois a elevação da FC ocorreu a partir do vigésimo minuto após a redução da pressão arterial e é sabido que o barorreflexo atua regulando a pressão de forma aguda, batimento a batimento.

O aumento da FR pode ser consequência da redução do fluxo sanguíneo para os pulmões e para os tecidos, decorrente da redução da pressão arterial, reduzindo a perfusão tecidual e a troca gasosa, aumentando então os níveis de CO_2 na circulação sanguínea, tendo como consequência aumento da frequência respiratória.

Após a avaliação da participação simpática é importante identificar e qualificar a participação parassimpática e para isso utilizamos um antagonista de receptor muscarínico (Metilnitrato de atropina) e obtivemos como resposta a morte dos ratos por parada cardiorrespiratória. Até o presente momento não sabemos justificar a mortes dos ratos do grupo Mercúrio. Porém, podemos postular que o acesso de pequenas concentrações deste antagonista a áreas bulbares da superfície ventral e dorsal em que a barreira hematoencefálica é

mais permeável e que estão envolvidas no controle respiratório possa ser uma explicação para este achado. O efeito da injeção intracisternal de cloreto de mercúrio na regulação neural do sistema cardiovascular não havia sido objeto de nenhuma investigação até o presente momento. Nossos resultados evidenciam, pela primeira vez, alterações decorrentes da ativação de áreas responsáveis por regular a pressão arterial, frequência cardíaca e frequência respiratória, promovidas pelo cloreto de mercúrio e a participação do sistema nervoso autônomo nestas respostas.

VI CONCLUSÕES

Nossos resultados permitem concluir que o cloreto de mercúrio no sistema nervoso central promove alterações cardiorrespiratórias. Esses efeitos são dose-dependente, já que as doses 0,68µg/Kg, 1,2µg/Kg, 2,4µg/Kg de cloreto de mercúrio tem pouca ou nenhuma influencia sobre a regulação neural do sistema cardiorrespiratório de ratos, enquanto que a dose de 60µg/Kg de cloreto de mercúrio leva a alterações na pressão arterial e na frequência respiratória. Já a dose de 120µg/Kg cloreto de mercúrio tem efeito neurotóxico, culminando com óbito do animal.

Além disso, nossos resultados demonstram a participação do sistema nervoso autônomo nessa resposta, permitindo inferir que o cloreto de mercúrio esteja atuando em núcleos na superfície dorsal e ventral do bulbo, ativando núcleos responsáveis pela regulação do sistema cardiorrespiratório.

Os resultados obtidos são de grande importância, uma vez que até o presente momento nenhum estudo havia investigado os efeitos da microinjeção intracisternal de cloreto de mercúrio na regulação neural do sistema cardiorrespiratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal SK, Gelsema AJ, Calaresu FR. Neurons in rostral VLM are inhibited by chemical stimulation of caudal VLM in rats. *Am J Physiol*. 1989; 257:265-70.

Agarwal SK, Calaresu FR. Enkephalins, substance P and acetylcholine microinjected into the nucleus ambiguus elicit vagal bradycardia in rats. *Brain Research* 1991; 563: 203-208.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for mercury. Washington (DC): ATSDR, Public Health Service, US Department of health and human services: 1999. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pediatric/appendixb.html>. Acesso em : 10/05/2010).

Aiche, AS, Kurucz OS, Reis DJ, Milner TA. Nucleus tractus solitarius efferent terminals synapse on neurons in the caudal ventrolateral medulla that project to the rostral ventrolateral medulla . *Brain Research*. 1995; 693: 51–63.

Aizenman E, Lipton SA, Loring RH. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 1989; 2:1257–1263.

Alexandre, SC. Avaliação de área contaminada por mercúrio total em descoberto. Dissertação de Mestrado, 2006. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Alves FH, Crestani CC, Resstel LB, Correa FM. Cardiovascular effects of carbachol microinjected into the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. *Brain Res* 2007; 143: 161-168.

Amstrong DM, Ross CA, Pickel VM, John TM, Reis DJ. Distribution of dopamine-containing cell bodies in the rat medulla oblongata: demonstrated by

immunocytochemical localization of catecholamine biosynthetic enzymes. *Journal of Comparative Neurology*. 1982; 212: 173- 187.

Asano S, Eto K, Kurisaki E, Gunji H, Hiraiwa K, Sato M, Sato H, Hasuike M, Hagiwara N, Wakasa H. Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Pathol Int*. 2000; 50:169-174.

Aschner M, Yao CP, Allen JW, Tan KH. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem* 2000; 37: 199-206.

Atchison WD. Extracellular calcium-dependent and independent effects of methylmercury on spontaneous and potassium-evoked release of acetylcholine at the neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; 237: 672–680.

Atchison WD, Narahashi T. Methylmercury-induced depression of neuromuscular transmission in the rat. *NeuroToxicology* 1982; 3: 37– 50.

Azevedo FA. Toxicologia do Mercúrio. São Carlos: RiMa, 2003.

Bagentose LM, Salgame P, Monestier M. Murine mercury-induced autoimmunity: a model of chemically related autoimmunity in humans. *Immunol Res* 1999; 20: 67-68.

Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaqi L, Murtadha N, Khalidi A, Al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 1973; 181: 230-241.

Ballatori N, Clarkson TW. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundam Appl Toxicol*. 1985; 5: 816-31.

Barman SM, Gebber GL, Calaresu FR. Differential control of sympathetic nerve discharge by the brainstem. *American Journal of Physiology* 1984; 262: 513-519.

Berlin M. Mercury. In: Friberg, L; Nordberg, GF; Voulk, V. Handbook on the toxicology of metals, 2nd, Amsterdam. Elsevier Science Publisher, 387-445; 1986.

Bieger D, Hopkins DA. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *The Journal of Comparative Neurology* 1987; 262: 546-562.

Boening DW. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosp.* 2000; 40: 1335-1351.

Bogle RR, Pires JGP, Ramage AG. Evidence that central 5HT₁ receptors play a role in the von Bezold Jarisch reflex in the rat. *British Journal of Pharmacology*. 1990; 100: 757-760.

Bohets HH, Van Thielen MN, Van Der BI, Van Landeghem GF, D'Haese PC, Nouwen EJ, De Broe ME, Dierlickx PJ. Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK₁, MDCK and human proximal tubular cells. *Kidney Int* 1995; 47: 395-403.

Brodkin E, Copes R, Mattman A, Kennedy J, Kling R, Yassi A. Lead and mercury exposures: interpretation and action. *CMAJ*. 2007; 176: 59-63.

Brookes N. In vitro evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. *Toxicology* 1992; 76: 245 -256.

Burton CA, Hatlelid K, Divine K, Carter DE, Fernando Q, Brendel K, Gandolfi AJ. Glutathione effects on toxicity and uptake of mercuric chloride and sodium arsenite in rabbit renal cortical slices. *Environ Health Perspec.* 1995; 103: 81-84..

Campos Jr. R, Colombari E, Cravo S, Ubriano O. Hipertensão arterial: o que tem a dizer o sistema nervoso. *Revista Brasileira de Hipertensão Arterial* 2001; 8: 41-54.

Campos RR, Carillo BA, Oliveira-Sales EB, Silva AM, Silva NF, Futuro Neto HA, Bergamaschi CT. Role of the caudal pressor area in the regulation of sympathetic vasomotor tone. *Brazilian Journal of medical and biological research* 2008, 41: 557-562.

Cassel MD, Roberts L, Talman WT. Glycine containing terminals in the rat dorsal vagal complex. *Neuroscience* 1992; 50: 970-971.

Chan SH, Ong BT, Wong PT. Suppression of arterial pressure, heart rate and cardiac contractility following microinjection of kainic acid into the nucleus ambiguus of the rat. *Neuroscience Letters* 1984; 47: 57-62.

Chao-Sheng H, Narahashi T. Mercury Chloride Modulation of the GABAA Receptor–Channel Complex in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1996; 140: 508–520.

Cheng Z, Powley TL. Nucleus ambiguus projections to cardiac ganglia of rat atria: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol.* 2000; 424: 588-606.

Chistravanshi VC, Agarwal SH, Calaresu FR. Microinjection of glycine into the nucleus ambiguus elicits tachycardia in spinal rats. *Brain Research* 1991; 566: 290-294.

Clarkson TW. Molecular and ionic Mimicry of Toxic Metals. *Annu, Research Pharmacol. Toxicol.* 1993; 32: 545-571.

Clarkson TW. The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1997; 34: 369-403.

Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med.* 2007; 50: 757-764.

Cravo S, Rosa D, Hinrichs J. Os núcleos vasomotores do bulbo e a regulação cardiovascular : novas evidencias e novas questões. *X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular* 2009; 39: 89-100.

Crestani CC, Alves FH, Resstel LB, Correa FM. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjection in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. *J Neurosci Res*, 2007; 85: 1592-1599.

Dangelo JG, Fanttini CA. Anatomia humana sistêmica e segmentar .3. Ed. São Paulo: Atheneu,2007.

Davidson PW, Myers GJ, Weiss B, Shamlaye DF, Cox C. Prenatal methyl mercury exposure from fish consumption and child development: a review of evidence and perspectives from the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology* 2006; 27: 1106-1109.

Davis LE, Kornfeld M, Mooney HS, Fiedler KJ, Haaland KY, Orrison WW, Cernichiari E, Clarkson TW. Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. *Ann Neurol* 1994; 35: 680-688.

Ekino S, Susa M, Ninomiya T, Imamura K, Kitamura T. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences* 2007; 262: 131–144.

Environmental Protection Agency - USA. Mercury Study Report to Congress. U.S. Environmental Protection Agency; Washington, DC, 1997.

Fukumori R, Nishigori Y, Goshima Y, Kubo T. Contribution of the medial amygdaloid nucleus to the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett*. 2004; 365: 128-131.

Gatti PJ, Johnson TA, Massari VJ. Can neurons in the nucleus ambiguous selectively regulate cardiac rate and atrio-ventricular conduction? *Journal of the Autonomic Nervous System* 1996; 57: 123-127.

Gebber, GL. Central determinants of sympathetic nerve discharge. In: LOEWY, AD. & SPYER, K.M. Central Regulation of Autonomic Functions, Oxford University Press, Inc., New York, 1990. p. 126-144.

Gilbey MP, Jordan D, Spyer KM, Wood LM. The inhibitory actions of GABA on cardiac vagal motoneurons in the cat. *The Journal of Physiology* 1984; 349: 361.

Gilman AG, Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11 ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana Brasil; 2007.

Gleichmann E, Kimber I, Purchase IF. Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system. A discussion. *Arch Toxicol*. 1989; 63: 257-273.

Gochfeld M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2003; 56: 174-179.

Gómez MG, Boffetta P, Klink JDC, Español S, Quintana JG, Colin D. Mortalidad por cáncer en los mineros del mercurio. *Gaceta Sanitaria* 2007; 21: 210-217.

Graeme AK, Pollack CV. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. *The Journal of Emergency Medicine* 1998; 16: 45-56.

Guyenet PG. Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Circulation Research*. 1985; 56: 359-369.

Guyenet PG, Darnall RA, Riley TA. Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats. *Am J Physiol*. 1990; 259: 1063-1074.

Halbach S, Clarkson TW. Enzymatic oxidation of mercury vapor by erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1978; 523: 522-531.

Hansen JC, Danscher G. Organic mercury na environmental therat to the health of dietary-exposed societies? *Rev Environ Health* 1997; 12: 107-116.

Hilton SM. Hypothalamic regulation of the cardiovascular system. *Br Med Bull* 1966; 22: 243-248.

Hopkins DA, Armour JA. Medullary cells of origin of physiologically identified cardiac nerves in the dog. *Brain Research Bulletin* 1982; 8: 359-365.

Horiuchi J, Killinger S, Dampney RA. Contribution to sympathetic vasomotor tone of tonic glutamatergic inputs to neurons in the RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 287: 1335-1343.

Houser MT, Milner LS, Kolbeck PC, Wei SH, Stohs SJ. Glutathione monoethyl ester moderates mercuric chloride-induced acurte renal failure. *Nephron* 1992; 61: 449-455.

Houston MC. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med*. 2007; 13: 128-33.

HSDB – Hazardous Substances Data Bank. Mercury. In: Toxicology, occupational medicine and environmental series. 2004. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov>. Acesso em: 20/05/ 2010.

Hsieh JH, Chen RF, Wu JJ, Yen CT, Chai CY. Vagal innervation of the gastrointestinal tract arises from dorsal motor nucleus while that of the heart largely from nucleus ambiguus in the cat. *J Auton Nerv Syst*. 1998; 70: 38-50.

Huang CS, Narahash T. Mercury Chloride Modulation of the GABAA Receptor–Channel Complex in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1996; 140: 508–520.

Hylander LD, Meili M. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Sci Total Environ.* 2003; 304:13-27.

Izzo PN, Deuchars J, Spyer KM. Localization of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the rat: immunocytochemical evidence of synaptic inputs containing 5-hydroxytryptamine. *The Journal of Comparative Neurology* 1993; 327: 572-583.

Johnson CL. Mercury in the Environment: Sources, toxicities, an prevention of exposure. *Pediat. ann.* 2004; 33: 437 – 442.

Jordan D. Vagal control of the heart: central serotonergic (5-HT) mechanisms. *Experimental Physiology.* 2004; 90: 175-181.

Kalia, M. Brainstem localization of vagal preganglionic neurons. *Journal of the Autonomic Nervous System.* 1981; 3: 451-481.

Kalia M, Sullivan JM. Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol.* 1982; 211: 248-265.

Kishi T, Hirooka Y, Sakai K, Shigematsu H, Himokawa H, Takeshita A. Overexpression of eNOS in the RVLM Causes Hypotension and Bradycardia Via GABA Release. *Hypertension* 2001; 38: 896-901.

Kubo T, Kanaya T, Numakura H, Okajima H, Hagiwara Y, Fukumori R. The lateral septal area is involved in mediation of immobilization stress-induced blood pressure increase in rats. *Neurosci Lett*, 2002; 318: 25-28.

Lazarewicz JW, Wroblewski JT, Palmer ME, Costa E. Reduction of disulfide bonds activated NMDA-sensitive glutamate receptors in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neurosci. Res. Commun.* 1989; 4: 91–97.

Lindberg, SE; Bullock, OR; Ebinghaus, R; Engstron, DR; Feng, X; Fitzgerald, WF; Pirrone, N; Prestbo, E; Seigneur, C. A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *Ambio*. 2007; 36: 19-32.

Loewy AD, Spyer KM. Vagal preganglionic neurons. In: Loewy AD, Spyer KM. (Org.), Central Regulation of Autonomic Functions, Oxford University Press, Inc., New York, p. 68-87, 1990.

Loewy AD. Forebrain nuclei involved in autonomic control. *Prog Brain Res*. 1991; 87: 253-268.

Loewy AD, McKellar S. The neuroanatomical basis of central cardiovascular control. *Fed Proc* 1980; 39: 2495-2503.

Loewy AD, Spyer KM. Vagal preganglionic neurons. In: Central Regulation of Autonomic Functions. Edited by Loewy, AD; Spyer, KM. Oxford University Press, Inc, New York, pp 68-87, 1990.

Machado AC, Padilha AS, Wiggers GA, Siman FDM, Stefanon I, Vassallo DV. Small doses of mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2007; 24: 92-97.

Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. *Hypertension* 1986; 42: 292-297.

Malmstrom, Hanson M, Nylander M. Conference on Trace elements in Health and disease. *Stockholm*, 1992.

Marchenko V, Sapru HN. Cardiovascular responses to chemical stimulation of the lateral tegmental field and adjacent medullary reticular formation in the rat. *Brain Res*. 2003; 977: 247-260.

Massari VJ, Dickerson LW, Gray AL, Lauenstein JM, Blinder KJ, Newsome JT, Rodak DJ, Fleming TJ, Gatti PJ, Gillis RA. Neural control of left ventricular

contractility in the dog heart: synaptic interactions of negative inotropic vagal preganglionic neurons in the nucleus ambiguus with tyrosine hydroxylase immunoreactive terminals. *Brain Research* 1998; 802: 205-220.

Massari VJ, Johnson TA, Gatti PJ. Cardiotopic organization of the nucleus ambiguus? An anatomical and physiological analysis of neurons regulating Atrioventricular conduction. *Brain Research* 1995; 679: 227-240.

Massaroni L, Oliveira EM, Stefanon I, Vassallo DV. Effects of Mercury on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1992; 25: 861-864.

Massaroni L, Rossoni LV, Amaral SMC, Stefanon I, Oliveira EM, Vassallo DV. Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of Mercury in anaesthetized rats and in Langendorff perfused rat hearts. *Pharmacological Research* 1995; 32: 27-36.

Mauad H, Machado BH. Involvement of the ipsilateral rostral ventrolateral medulla in the pressor response to L-glutamate microinjection into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *J Auton Nerv Syst.* 1998; 74: 43-48.

McAllen RM, Spyer KM. The location of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the medulla of the cat. *The Journal of Physiology* 1976; 258: 187-204.

Mckay SJ, Reynolds JN, Racz WJ. Effects of mercury compounds on the spontaneous and potassium-evoked release of [3H]-dopamine from mouse striatal slices. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1986; 64: 1507-1514.

Micaroni RCC, Bueno MIMS, Jardim WF. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Quími.* 2000; 23: 487-495.

Miyamoto MD. Hg²⁺ causes neurotoxicity at an intracellular site following entry through Na and Ca channels. *Brain Res.* 1983; 267: 375-379.

Nakazato Y, Asano T, Ohga A. The *in vitro* effect of mercury compounds on noradrenaline output from guinea pig vas deferens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1979; 48: 171–177.

Nascimento ES, Chasin AAM. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. *Cadernos de Referência Ambiental* 2001; 1: 176-178.

Nosaka S, Yamamoto T, Yasunaga K. Localization of vagal cardioinhibitory preganglionic neurons with rat brain stem. *J Comp Neurol.* 1979; 186: 79-92.

Nosaka S, Yasunaga K, Tamai S. Vagal cardiac preganglionic neurons: distribution, cell types and reflex discharges. *American Journal of Physiology* 1982; 243: 92-98.

Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR. Upregulation of AT1R and iNOS in the Rostral Ventrolateral Medulla (RVLM) Is Essential for the Sympathetic Hyperactivity and Hypertension in the 2K-1C Wistar Rat Model. *American Journal of Hypertension* 2010; 23: 708-715.

Passos CJ, Mergler D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad Saude Publica.* 2008; 24: 503-520.

Pelletier L, Hirsch F, Rossert J, Druet E, Druet P. Experimental mercury- induced glomerulonephritis. *Springer Semin Immunopathol.* 1987; 9: 359-369.

Pelosi GG, Correa FM. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the dorsal periaqueductal gray area of unanaesthetized rats. *Eur J Neurosci.* 2005; 22: 3188-3194.

Pestana MHD, Formoso MLL. Mercury contamination in Lavras do Sul, south Brazil: a legacy from past and recent gold mining. *The Science of the Total Environment.* 2003; 307: 125-40.

Pinna G, Alessandrini F, Alfieri A, Rossi M, Bricolo A. Cerebrospinal fluid flow dynamics study in Chiari I malformation: implications for syrinx formation. *Neurosurg Focus*. 2000; 8: 1-7.

Pires JG, Silva SR, Ramage AG, Futuro-Neto HA. Evidence that 5-HT₃ receptors in the nucleus tractus solitarius and other brainstem areas modulate the vagal bradycardia evoked by activation of the von Bezold-Jarisch reflex in the anesthetized rat. *Brain Res*. 1998; 27: 229-234.

Resstel LB, Correa FM. Pressor and tachycardic responses evoked by microinjections of L-glutamate into the medial prefrontal cortex of unanaesthetized rats. *Eur J Neurosci*. 2005; 21: 2513-2520.

Resstel LB, Souza RF, Guimaraes FS. Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. *Physiol Behav* 2008; 93: 200-205.

Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, John TH, Sved AF, Fernandez-Pardal J, Saavedra JM, Reis DJ. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate and plasma catecholamines and vasopressin. *Neuroscience* 1984; 4: 474- 494.

Rossoni LV, Cunha V, França A, Vassallo DV. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1999; 34: 887-892.

Scopinho AA, Resstel LB, Antunes-Rodrigues J, Correa FM. Pressor effects of noradrenaline injected into the lateral septal area of unanesthetized rats. *Brain Res*. 2006; 29: 126-134.

Silva NF, Pires JGP, Futuro Neto HA. Cardiovascular and respiratory responses to microinjection of L- glutamate into the caudal pressor area in conscious and

anesthetized rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2001; 34: 1603-1606.

Sproull DH. The origin of the hyperglycaemic response to intracisternal adrenaline in the cat: the site of systemic absorption and of central action of adrenaline from the subarachnoid space. *Jornal Physiology* 1963; 169: 538-552.

Spyer K.M. The central nervous organization of reflex circulatory control. In: Loewy AD, Spyer KM, Central Regulation of Autonomic Functions. Oxford University Press, Inc., New York, 1990.

Spyer KM. Baroreceptor control of vagal preganglionic activity. In: Integrative Functions of the Autonomic Nervous System. Edited by Brooks CM, Koizumi K, Sato A. University of Tokyo Press, 1979.

Stacchiotti A, Lavazza A, Rezzani R, Borsani E, Rodella L, Bianchi R. Mercuric chloride-induced alterations in stress protein distribution in rat kidney. *Histol Histopathol* 2004; 19: 1209–1218.

Sved AF, Ito S, Madden CJ. Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. *Brain Res Bull*. 2000; 51:129-133.

Sved AF, Gordon FJ. Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. *News Physiol Sci*. 1994; 9: 243-246.

Swain EB, Jakus PM, Rice G, Lupi F, Maxson PA, Pacyna JM, Penn A, Spiegel SJ, Veiga MM. Socioeconomic consequences of mercury use and pollution. *Ambio*. 2007; 36:45-61.

Takanaga A, Hayakawa T, Tanaka K, Kawabata K, Maeda S, Seki M. Immunohistochemical characterization of cardiac vagal preganglionic neurons in the rat. *Auton Neurosci*. 2003; 106: 132-137.

Takeuchi T, Eto K, Kinjo Y, Tokunaga H. Human brain disturbance by methylmercury poisoning, focusing on the long-term effect on brain weight. *Neurotoxicology* 1996; 17: 187-190.

Tavares RF, Correa FM. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. *Neuroscience* 2006; 143: 231-40.

Traxinger DL, Atchison WD. Comparative effects of divalent cations on the methylmercury-induced alterations of acetylcholine release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987; 240: 451–459.

Urbanski, R. W.; Sapru, H. N. Putative neurotransmitters involved in medullary cardiovascular regulation. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1988; 25: 181-193.

Vassallo DV, Massaroni L, Oliveira EM, Rossoni LV, Amaral SMC, Vassallo PF. Ações Tóxicas Agudas do Mercúrio sobre o Aparelho Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 1996, 67:39-45.

Verberne AJ, Guyenet PG. Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat. *American Journal of Physiology* 1992; 263: 1195-202.

Von Euler C. Brain stem mechanisms for generation and control of breathing pattern. In Anonymous Handbook of Physiology, American Physiological Society, Washington, DC, 1979.

Walker P, Carrive P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neuroscience* 2003; 116: 897-912.

Webb, JL. Mercurial. In Enzyme and Metabolic Inhibitors. Academic Press, New York and London, 1966.

Weinsberg F, Bickmeyer U, Wiegand H. Effects of inorganic mercury (Hg²⁺) on calcium channel currents and catecholamine release from bovine chromaffin cells. *Arch Toxicol*. 1995; 69:191-196.

Willis A, Mihalevich M, Neff RA, Mendelowitz D. Three types of postsynaptic glutamatergic receptors are activated in DMNX neurons upon stimulation of NTS. *Am J Physiol*. 1996; 271:1614-1609.

World Health Organization. Methyl Mercury. V. 101. International Programme on Chemical Safety. Geneva, Switzerland, 1990.

Yee S, Choi BH. Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain. *Exp Mol Pathol*. 1994; 60:188-96.

Yu D, Gordon FJ. Anatomical evidence for a bi-neuronal pathway connecting the nucleus tractus solitarius to caudal ventrolateral medulla to rostral ventrolateral medulla in the rat. *Neuroscience Letters* 1996; 205: 21-4.

Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev*. 2000; 2:113-43.

ANEXO 1

Manuscrito submetido à revista NeuroToxicology:

Acute cardiorespiratory effects of intracisternal injections of mercuric chloride

Bruna Fernandes Azevedo ^a, Henrique de Azevedo Futuro Neto ^{b,c,d}, Ivanita Stefanon ^a, Dalton Valentin Vassallo ^{a,c}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brazil.

^b Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brasil.

^cEscola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia, Espírito Santo, Brasil.

^d Faculdade de Medicina da Univix, Espírito Santo, Brazil.

E-mail: brunafernandes.azevedo@gmail.com; henrique.futuro.neto@pq.cnpq.br;

ivanita@pq.cnpq.br; daltonv2@terra.com.br.

Corresponding author at:

Dalton V. Vassallo

Departamento de Ciências Fisiológicas

Av. Marechal Campos, 1468

Maruípe - 29040-091 Vitória ES, Brasil.

FAX: 55-27-2122 7330.

e-mail: daltonv2@terra.com.br

Abstract

The present studies were conducted to changes arising from mercury poisoning in the central nervous system (CNS), with a focus on determining the receptors and neurotransmitters involved. Currently, little is known regarding the neurological basis of the cardiopulmonary effects of mercury poisoning. We evaluated changes in systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), respiratory rate (RR) and heart rate (HR) following a 5 μ l intracisternal (i.c) injection of mercuric chloride (HgCl_2) and the participation of the autonomic nervous system in these responses. Animals were utilized 58 distributed randomly into 10 groups and administered a 5 μ l intracisternal injection of 0.68 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 (n =7), 1.2 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 (n=7), 2.4 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 (n=7), 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 (n=7), 120 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 (n=3), saline (control) (n=7), 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 plus prazosin (n=6), saline plus prazosin (n=6), 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 plus metilatropina (n=4) or saline plus metilatropina (n=4) HgCl_2 . Anesthesia was induced with halothane and maintained as needed with urethane (1.2 g/kg) administered intravenously (i.v.) through a cannula placed in the left femoral vein. The left femoral artery was also cannulated to record systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP) and heart rate (HR). A tracheotomy was performed to record respiratory rate. Animals were placed in a stereotaxic frame, and the cisterna magna was exposed. After a stabilization period, solutions (saline or HgCl_2) were injected i.c., and cardiopulmonary responses were recorded for 50 minutes. Involvement of the autonomic nervous system was assessed through the i.v. injection of hexamethonium (20 mg/kg), prazosin (1 mg/kg) and methylatropine (1mg/kg) 10 minutes before the i.c. injection of HgCl_2 or saline. Treatment with 0.68, 1.2, 2.4 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 or saline did not modify basal cardiorespiratory parameters, whereas the 120 $\mu\text{g/kg}$ dose induced acute toxicity, provoking respiratory arrest and death. The administration of 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 , however, induced significant increases ($p < 0.05$) in SAP at the 30°, 40° and 50° min, timepoints and DAP at the 5°, 10°, 20°, 30°, 40° and 50° timepoints. RR was significantly decreased at the 5°, 10°, 20°, 40° and 50°min timepoints; however, there was no change in HR. Hexamethonium administration, which causes non-specific inhibition of the autonomic nervous system, abolished the observed cardiorespiratory effects. Similarly, prazosin, a α_1 -adrenoceptor blocker that specifically inhibits sympathetic nervous system function, abolished HgCl_2 induced increases in SAP and DAP without affecting HR and RR. Methylatropine (1mg/Kg), a parasympathetic nervous system inhibitor, exacerbated the effects of HgCl_2 and caused slow-onset respiratory depression, culminating in respiratory arrest and death. Our results demonstrate that increases in SAP and DAP induced by the i.c. injection of mercuric chloride are mediated by activation of the sympathetic nervous system.

Keywords: Mercury chloride, central effects, cardiopulmonary regulation.

1. Introduction

Due to its toxicity and mobility in ecosystems, mercury is considered to be an environmental pollutant that poses a high health risk (Davis et al., 1994). Ingestion or inhalation of mercury is known to induce toxicity in a number of different biological systems, including the heart, lung, kidney, brain and immune system (Oliveira et al., 1994, Houser et al., 1992, Gómez et al., 2007; Gleichmann et al., 1989). In Iraq, the ingestion of bread made with mercury-contaminated wheat resulted in the deaths of over 500 people (Bakir et al., 1973). Similar cases of mercury poisoning due the ingestion of contaminated wheat have been reported in Pakistan (1963), Guatemala (1966), Argentina (1980) and New Mexico (Bakir et al., 1973; Clarkson, 1993; Saint-Phard & Van Dorsten, 2004).

Mercury is highly neurotoxic (Bakir et al., 1973, Gochfeld, 2003). Patients in Japan and Iraq suffering from mercury poisoning presented with symptoms of neural dysfunction, including ataxia, the deterioration of speech, decreased in the visual field, sensory changes, deafness, blindness, tremors, involuntary movements, mental retardation, coma and death. These clinical symptoms of mercury poisoning have been described as Minamata disease and Hunter-Russell syndrome (Gochfeld, 2003, Takeuchi et al., 1996).

Currently, studies on the effects of mercury in the central nervous system (CNS) focus on determining which neurotransmitters and receptors are involved in the neurotoxicity of mercury. Despite these efforts, much remains unknown, particularly with regard to cardiopulmonary effects induced by mercury poisoning (Coa, et al., 2010, Atchison and Narahashi, 1982, Atchison, 1986, Shafer et al., 1990). This study was designed to evaluate of mercury dose could

alter the neural regulation of cardiorespiratory system when used acutely in central nervous system and determine the role of the autonomic nervous system in this process.

2. Materials and methods

Male Wistar rats weighing 300 g were used for this study. All experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research provided by the Brazilian Societies of Experimental Biology and approved by the Institutional Ethics Committee (CEUA-EMESCAM 003 and 021/2007). The animals were housed under standard laboratory conditions with water and food provided ad libitum, and environmental temperature was set at $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Rats were anesthetized with vaporized halothane gas (3%) in an induction chamber and maintained under anesthesia with intravenous (i.v.) administration of urethane (1.2 g/kg). Supplementary doses of anesthetic were administered when necessary, as indicated by the paw pinch reflex and/or by unstable cardiovascular recordings. For i.v. drug administration, the left femoral vein was cannulated with a heparinized (40 U/ml) catheter (PE 50) filled with saline. Arterial blood pressure was recorded using a heparinized (40 U/ml) saline-filled catheter (PE 50) inserted into the left femoral artery and connected to a pressure transducer (Statham P23 Db, Valley View, OH, USA). Systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP) and heart rate (HR) were recorded with a Gould RS 3400 polygraph. A tracheotomy was performed on all animals, and the respiratory rate (RR) was recorded using a pneumotachograph (Fleish 0000) and a low-pressure transducer (Valadine) connected to a polygraph. All cardiovascular and respiratory activity data were digitalized

(Biopac MP 100) and stored on a computer hard drive prior to analysis. A homeothermic blanket (Harvard) was used to maintain rectal temperatures between 36-37°C.

Animals were mounted on a stereotaxic apparatus (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) to provide stabilization and bilateral symmetry of the skull. The lifting bar was placed in the ear, and the external auditory canal incisive barrier was set at -11 mm. For intracisternal (i.c.) injections, the dorsal surface of the brainstem was exposed by retracting the skin and muscles at the base of the skull, allowing visualization of the atlanto-occipital membrane. Mercuric chloride (HgCl_2) injections were performed with a Mizzi needle inserted into the cisterna magna. The Mizzi needle was connected to a microsyringe (Hamilton, 10 μL) and a polyethylene (PE 10) catheter filled with the injection solution.

Animals were utilized 58 distributed randomly into 10 groups and administered a 5 μL intracisternal injection of 0.68 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 (n=7), 1.2 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 (n=7), 2.4 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 (n=7), 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 (n=7), 120 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 (n=3), saline (control) (n=7), 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 plus prazosin (n=6), saline plus prazosin (n=6), 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 plus metilatropina (n=4) or saline plus metilatropina (n=4). Data recordings began after hemodynamic stabilization was achieved. All microinjections were performed at the after 0 timepoint, after baseline recordings were obtained. SAP, DAP, HR and RR were recorded at the following timepoints: 0 (prior to i.c. injection) and 5, 10, 20, 30, 40 and 50 min injection of HgCl_2 or Saline. To evaluate the involvement of the autonomic nervous system in cardiorespiratory responses to mercury, animals were also administered the following drugs: hexamethonium (20 mg/kg, i.v), a ganglionic blocker that causes non-specific inhibition of the autonomic nervous system;

prazosin (1 mg/kg, i.v), an α 1-receptor blocker that inhibits only the sympathetic branch of the autonomic nervous system; and methylatropine (1 mg/kg, i.v), a cholinergic blocker that inhibits only the parasympathetic branch of the autonomic nervous system. The effect of these drugs on basal cardiorespiratory regulation was assessed before and 10 min after their injections. Data were collected at the following timepoints: 0 (stabilization), 10 min after administered hexamethonium/methylatropine/prazosin and 5, 10, 20, 30, 40 and 50 min after injection of HgCl₂ or Saline.

Data are presented as the mean \pm SEM. The two-way ANOVA analysis followed by post-hoc Bonferroni tests. Significance was assumed at $p < 0.05$.

3. Results

Treatment with 0.68, 1.2, and 2.4 μ g/kg HgCl₂ or saline did not modify basal cardiorespiratory parameters, whereas 120 μ g/kg HgCl₂ induced acute toxicity, resulting in respiratory arrest and death. Microinjection of 60 μ g/kg HgCl₂, on the other hand, induced a significant increase ($p < 0.05$) in SAP and DAP while reducing the RR (Figure 1A-B and 2B).

To determine the role of the autonomic nervous system in these cardiopulmonary changes, hexamethonium (20 mg/kg, i.v.), a ganglionic blocker, was administered. Hexamethonium induced similar decreases in SAP, DAP, HR and RR in both control and experimental groups and resulted in the reversal of several cardiorespiratory effects observed in animals treated with 60 μ g/kg HgCl₂ (see Table 1).

The autonomic nervous system is composed of two subsystems: the sympathetic and parasympathetic nervous systems. We further elucidated the

role of the autonomic nervous system using prazosin, a α_1 -adrenergic antagonist that inhibits sympathetic function, and methylatropine, a cholinergic receptor blocker that inhibits parasympathetic function. Prazosin partially abolished the effects of HgCl_2 on SAP, DAP, RR and increased the HR (Figure 3A-B and 4A-B). Methylatropine (1mg/kg, i.v.), however, exacerbated the cardiorespiratory effects of HgCl_2 , causing slow-onset respiratory depression that culminated in respiratory arrest and death.

4. Discussion

The present study demonstrates that HgCl_2 induces changes in the cardiorespiratory regulation, characterized primarily by increases in SAP and DAP and reduced RR. Furthermore, our results elucidate the role of the autonomic nervous system in these responses as autonomic blockade abolished hemodynamic and RR changes. Our use of i.c. microinjections allows substances to access various sites in the dorsal and ventral surfaces of the medulla (Sproull, 1963). The floor of the fourth ventricle and the ventral surface areas are involved in various mechanisms of central autonomic and respiratory regulation. It is likely that the observed changes in cardiorespiratory regulation are the consequence of HgCl_2 toxicity in these areas; however, the present technique is unable to confirm the precise brain regions targeted.

The present study was aimed to evaluate the effects of intracisternal injection of HgCl_2 in the central control of cardiovascular and respiratory systems, given that our discussion will be made through hypotheses that justify the changes in central control of cardiovascular and respiratory systems.

The doses of 0.68, 1.2, and 2.4 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 were not able to cause cardiovascular and respiratory changes when injected into the CNS, being considered in our study doses with little or no effect neurotoxic.

It is possible that the observed increases in SAP and DAP induced by injection of 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 are due to inhibition of glutamate uptake by the rostral ventrolateral medulla (RVLM). This would result in extended RVLM stimulation causing an increase in sympathetic activity that, in turn, increases SAP and DAP. Indeed, Brookes (1992) and Aschner et al. (2000) reported that methylmercury inhibits glutamate uptake, increasing glutamatergic stimulation of the CNS that can result in cell death and neurodegeneration. Alternatively, inhibition of the nucleus of the solitary tract (NTS) through GABA receptor stimulation would result in G_i -protein activation and the opening of chloride ion channels. These changes would lead to inhibition of the caudal ventrolateral medulla (CVLM) and RVLM activation. Huang and Narahashi (1996) demonstrated that mercury can bind to sulhydryl groups in dorsal root ganglion neurons, resulting in the activation of G_i proteins and the opening of chloride ion channels.

In addition to the effects on SAP and DAP, we observed significant reductions in RR (figure 4) following i.c. treatment with HgCl_2 . This could be mediated through direct neurotoxicity or cell death indirectly induced by glutamate overstimulation in the nucleus ambiguus (NA), a region that contains pre-respiratory motoneurons (Von Euler, 1979). On the other hand, the hyperpolarization of NTS through chloride ion channel activation could result from GABA receptor activation. GABA receptor activation inhibits NA activity, causing a reduction in the respiratory rate. When stimulated, the NA can

promote both bradycardia and tachycardia, depending on the receptor type that is activated. Studies in cats have shown that microinjection of L-glutamate within subregions of the NA promoted intense bradycardia (Massari et al., 1995, Gatti et al., 1996). Conversely, Chistravanshi et al. (1991) demonstrated that microinjection of glycine into the NA elicited tachycardia. It is possible that HgCl_2 interacts with both NA receptor types, thus resulting in a null effect on HR.

Based on these findings it was necessary to evaluate the participation of the autonomic nervous system in the cardiorespiratory changes induced by the i.c. injection of 60 mg/kg HgCl_2 . Hexamethonium, a ganglion blocker, reversed the cardiopulmonary effects triggered by 60 mg/kg HgCl_2 (Table 1), thus confirming the involvement of the autonomic nervous system as a mediator of cardiorespiratory responses. Hexamethonium, however, affects both the sympathetic and parasympathetic branches of the autonomic nervous system, thus preventing determination of the specific subsystem mediated the observed changes. We evaluated the role of the parasympathetic subsystem using methylatropine a muscarinic acetylcholine receptor antagonist. Vassallo et al. (1996) observed that atropine prolonged the survival of animals from 60 to 120 minutes following an i.v. injection of high concentrations of HgCl_2 . In the present study, all animals treated with methylatropine after i.c. HgCl_2 microinjection exhibited respiratory arrest and death. Although methylatropine does not cross the blood-brain barrier, it is absent in certain areas of the medulla. These areas are the putative sites of action for this anti-muscarinic drug. Inhibition of acetylcholine in these areas of the medulla would likely exacerbate HgCl_2 toxicity, explaining the observed respiratory arrest and death. It is important to

note, however, that the current results do not confirm this hypothesis. To evaluate the role of the sympathetic nervous system, prazosin, an α_1 -receptor antagonist, was used. The blockage of α_1 -receptors reversed the changes triggered by 60 mg/kg HgCl₂. These results indicate that the effects of HgCl₂ on cardiopulmonary regulation are likely driven by the sympathetic nervous system.

The present study suggest that 60 mg/kg HgCl₂ elicits a significant increase of SAP, DAP and reduced RR and that these effects are likely mediated through the activation of the sympathetic nervous system.

Conflict of interest statement

Declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This research was supported by funding from the FAPES/CAPES/CNPq

References

1. Aschner M, Yao CP, Allen JW, Tan KH. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem* 2000; 37:199-206.
2. Atchison WD. Extracellular calcium-dependent and independent effects of methylmercury on spontaneous and potassium-evoked release of acetylcholine at the neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; 237: 672–680.
3. Atchison WD, Narahashi T. Methylmercury-induced depression of neuromuscular transmission in the rat. *NeuroToxicology* 1982; 3: 37– 50.
4. Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, Al-Rawi NY. Methylmercury poisoning in Iraq. An interuniversity report. *Science* 1973; 18: 230–241.
5. Brookes N. In vitro evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. *Toxicology* 1992; 76: 245 -256.
6. Cao Y, Chen A, Jones RL, Radcliffe J, Caldwell KL, Dietrich KN, Rogan W. Does background postnatal methyl mercury exposure in toddlers affect cognition and behavior?. *Neurotoxicology* 2010; 31:1-9.
7. Chistravanshi VC, Agarwal SH, Calaresu FR. Microinjection of glycine into the nucleus ambiguus elicits tachycardia in spinal rats. *Brain Res.* 1991; 566:290-294.
8. Clarkson TW. Molecular and ionic Mimicry of Toxic Metals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1993; 32: 545-571.
9. Davis LE, Kornfeld M, Mooney HS, Fiedler KJ, Haaland KY, Orrison WW, Cernichiari E, Clarkson TW. Methylmercury poisoning: long-term clinical,

radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family.
Ann Neurol. 1994; 35:680-688.

10. Gatti PJ, Johnson TA, Massari VJ. Can neurons in the nucleus ambiguus selectively regulate cardiac rate and atrio-ventricular conduction? J Auton Nerv Syst. 1996; 57:123-127.
11. Gleichmann E, Kimber I, Purchase IF. Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system. A discussion. Arch Toxicol. 1989; 63:257-273.
12. Gochfeld M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. Ecotoxicol Environ Saf. 2003; 56:174-179.
13. Gómez MG, Boffetta P, Klink JDC, Español S, Quintana JG, Colin D. Mortalidad por cáncer en los mineros del mercurio. Gac Sanit. 2007; 21: 210-217.
14. Houser MT, Milner LS, Kolbeck PC, Wei SH, Stohs SJ. Glutathione monoethyl ester moderates mercuric chloride-induced acute renal failure. Nephron. 1992; 61:449-455.
15. Huang CS, Narahash T. Mercury Chloride Modulation of the GABAA Receptor– Channel Complex in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. Toxicology and Applied Pharmacology 1996; 140:508–520.
16. Massari VJ, Johnson TA, Gatti PJ. Cardiotoxic organization of the nucleus ambiguus? An anatomical and physiological analysis of neurons regulating atrioventricular conduction. Brain Res. 1995; 679:227- 240.
17. Oliveira EM, Vassallo DV, Sarkis JJ, Mill JG. Mercury effects on the contractile activity of isolated heart muscle. Toxicol Appl Pharmacol 1994; 128:86-91.

18. Saint-Phard D, Van Dorsten B. Mercury toxicity: clinical presentations in musculoskeletal medicine. *Orthopedics* 2004; 27: 394-399.
19. Shafer TJ, Contreras ML, Atchison WD. Characterization of interactions of methylmercury with Ca^{2+} channels in synaptosom and pheochromocytoma cells: Radiotracer flux and binding studies. *Mol. Pharmacol.* 1990; 38:102–113.
20. Sproull DH. The origin of the hyperglycaemic response to intracisternal adrenaline in the cat: the site of systemic absorption and of central action of adrenaline from the subarachnoid space. *Journal Physiology*. 1963; 169:538-552.
21. Takeuchi T, Eto K, Kinjo Y, Tokunaga H. Human brain disturbance by methylmercury poisoning, focusing on the long-term effect on brain weight. *Neurotoxicology*. 1996; 17: 187-190.
22. Vassallo DV, Massaroni L, Oliveira EM, Rossoni LV, Amaral SMC, Vassallo PF. Ações Tóxicas Agudas do Mercúrio sobre o Aparelho Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 1996, 67:39-45.
23. Von Euler C. Brain stem mechanisms for generation and control of breathing pattern. In Anonymous (Ed.), *Handbook of Physiology*. American physiological Society, Washington, pp 1-67, 1979.

Legends

Figure 1: (A) Systolic arterial pressure (SAP) and (B) diastolic arterial pressure (DAP) in control and 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 -treated animals before and after i.c. injection. Results are expressed as the mean \pm SEM. Two-way ANOVA, repeated measures. $p < 0.05$: * control ($n = 7$) vs. HgCl_2 -treated ($n = 7$) rats; # before vs after HgCl_2 treatment.

Figure 2: (A) Heart rate (HR) and (B) respiratory rate (RR) in control ($n = 7$) and 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 -treated ($n = 7$) animals before and after i.c. injection. Results are expressed as the mean \pm SEM. Two-way ANOVA, repeated measures. $p < 0.05$: * control vs. HgCl_2 -treated rats; # before vs. after HgCl_2 treatment.

Figure 3: (A) Systolic arterial pressure (SAP) and (B) diastolic arterial pressure (DAP) in control ($n = 6$) and 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 -treated ($n = 6$) animals before and after i.c. injection and administration of the α_1 -receptor blocker, prozasin. Results are expressed as the mean \pm SEM. Two-way ANOVA, repeated measures. $p < 0.05$: * control vs. HgCl_2 -treated rats; # before vs. after HgCl_2 treatment.

Figure 4: (A) Heart rate (HR) and (B) respiratory rate (RR) in control ($n = 6$) and 60 $\mu\text{g/kg}$ HgCl_2 -treated ($n = 6$) animals before and after i.c. injection and administration of the α_1 -receptor blocker, prazosin. The results are expressed as the mean \pm SEM. Two-way ANOVA, repeated measures. $p < 0.05$: * control vs. HgCl_2 -treated rats; # before vs. after HgCl_2 treatment.

Figure 1

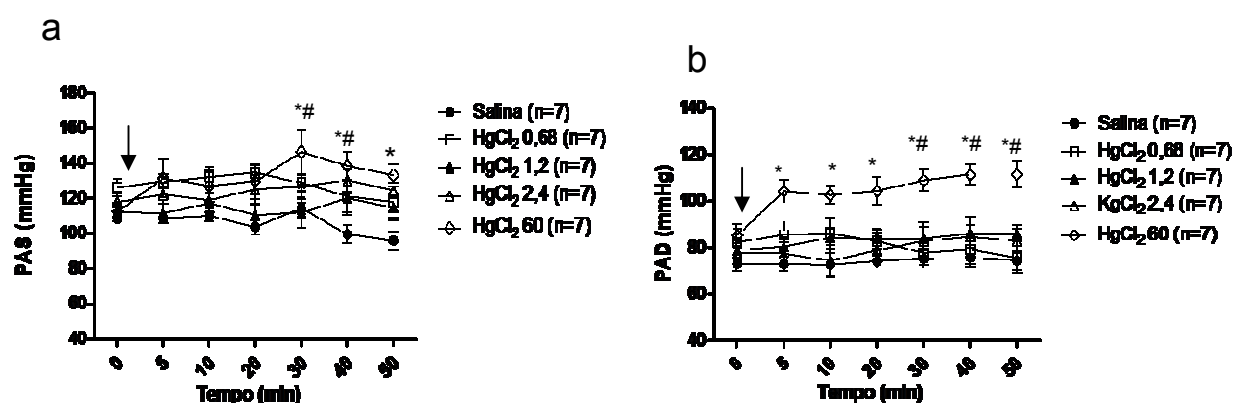


Figure 2

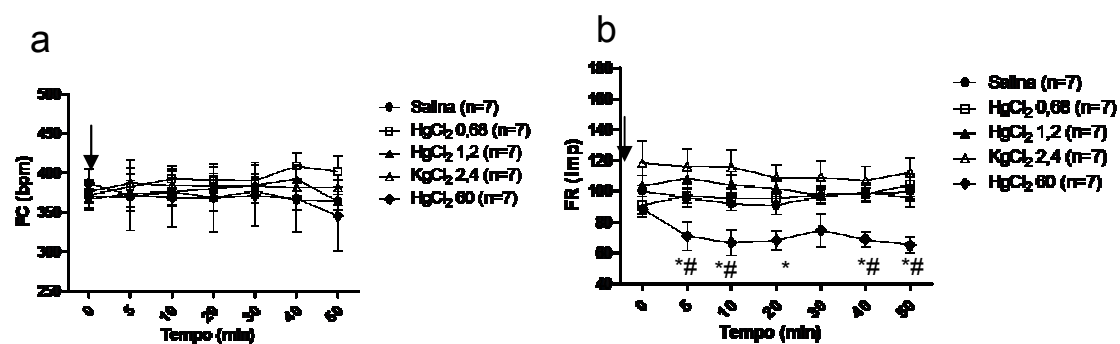


Figure 3

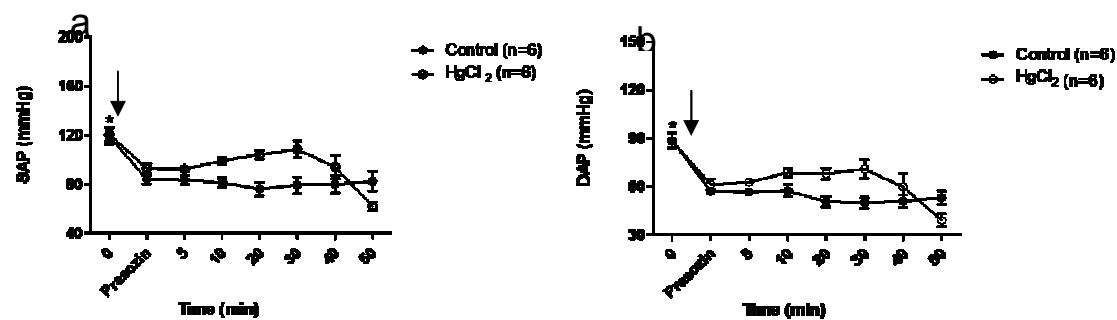


Figure 4

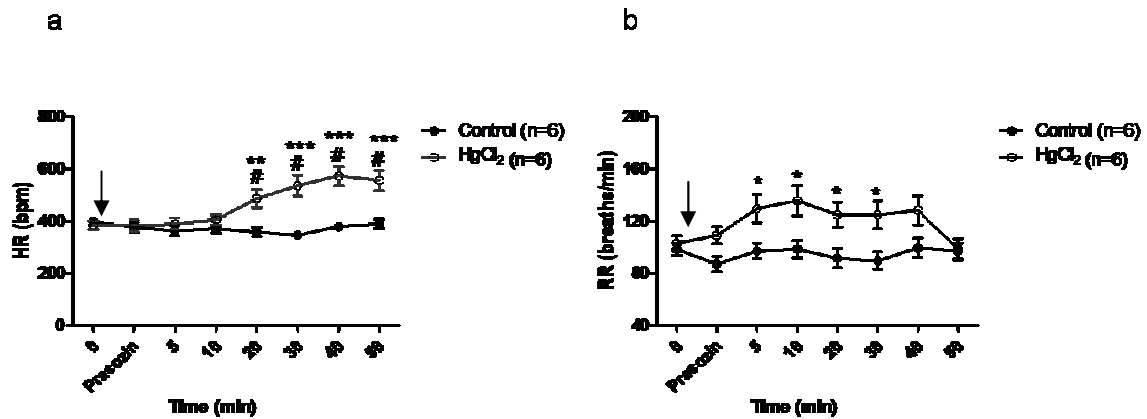


Table 1 Effect of administration of hexamethonium in control and mercury (60µg/kg) groups.

		Star	Hexa	5 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
SAP (mmHg)	Ct	125±3 [§]	87±1	92±2	90±3	92±3	94±5	95±2	95±3
	HgCl ₂	125±3 [§]	80±5	89±6	94±5	91±3	100±9	102±9	107±10
DAP (mmHg)	Ct	84±5 [§]	65±3	67±3	67±2	66±2	68±3	75±4	71±4
	HgCl ₂	88±3 [§]	57±4	65±5	67±4	64±4	63±5	65±6	67±6
HR (bpm)	Ct	399±15 [§]	369±7	377±8	373±13	376±12	381±15	385±18	389±21
	HgCl ₂	410±17 [§]	378±17	377±17	379±17	383±17	391±20	400±20	396±22
RR (breaths/min)	Ct	104±5 [§]	118±10	112±7	102±10	103±9	104±8	115±10	113±9
	HgCl ₂	102±5 [§]	115±12	112±11	110±9	112±5	108±4	117±8	110±8

Table 1: Systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), heart rate (HR), respiratory rate (RR) of control rats (CT) and mercury rats (HgCl₂). The results are expressed as mean ± SEM. 2-way ANOVA followed by Bonferroni post- tests for all analysis. Ct (n = 6) vs. HgCl₂ (n = 6). p < 0.05: * control vs. HgCl₂-treated rats; # before vs. after HgCl₂ treatment.; ∞ before vs. after hexamethônio.